

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

TÉTANOS CÉRÉBRAL ET IMMUNITÉ CONTRE LE TÉTANOS

PAR MM. E. ROUX ET A. BORREL¹.

I

Le tétanos a toujours été considéré comme une maladie du système nerveux, mais c'est seulement depuis la découverte de la toxine tétanique que l'on a pu dire, avec plus de précision, que le tétanos est un empoisonnement de certaines cellules nerveuses. Le poison tétanique agit sur les cellules de la moelle épinière dont la lésion détermine les contractures caractéristiques; injecté sous la peau ou dans le sang, il va les atteindre de préférence.

Il existe en effet une affinité véritable entre la cellule nerveuse et la toxine tétanique. Cette affinité se manifeste dans l'expérience suivante, inspirée par celle de MM. Wassermann et Takaki². De la substance cérébrale d'un cobaye est broyée, puis additionnée de toxine tétanique : le mélange soumis à l'action de la turbine se sépare en deux couches; au fond du vase, la matière nerveuse, au-dessus le liquide opalin³. Si les proportions de cerveau et de toxine sont bien choisies, on constate que le liquide ne contient presque plus de poison tétanique. Celui-ci, fixé par le tissu nerveux, s'est déposé en même temps que lui. Il n'est point détruit, comme le croyait M. Wassermann, il adhère aux débris de substance cérébrale à la façon d'une

1. Le résumé de ce travail a été communiqué au Congrès international d'hygiène et de démographie de Madrid, par M. Borrel, le 12 avril 1898.

2. *Berliner klinische Wochenschr.* 1898, N° 4.

3. V. KNORR. *Munch. med. Wochenschr.* 1898, N° 42, p. 187.

matière colorante et peut de nouveau être mis en évidence, comme l'a fait voir M. Metchnikoff¹. La toxine a changé d'état, mais sa nature n'est point modifiée.

Le véritable intérêt de l'expérience de M. Wassermann est de nous montrer, se satisfaisant *in vitro*, et pour ainsi dire d'une façon tangible, cette affinité de la cellule nerveuse et de la toxine tétanique.

Ce qui se passe dans notre tube à réaction se fait aussi dans l'organisme. La toxine tétanique, injectée sous la peau de la patte postérieure d'un cobaye, sera fixée par les cellules de la moelle épinière après un certain nombre d'heures, au bout desquelles apparaissent les contractures. Le poison arrive à l'axe nerveux par deux voies; une partie, d'après M. Marie², suit directement le trajet des nerfs, et c'est pour cela que, chez les animaux, la contracture commence toujours dans la région où l'injection a été pratiquée; une autre partie du poison pénètre dans le sang, d'où elle est extraite par les cellules nerveuses et peut-être encore par d'autres, suivant leur affinité.

Cette affinité spécifique des éléments nerveux pour la toxine tétanique s'exerce lorsqu'on introduit un peu de celle-ci dans la substance même du cerveau d'un lapin. On détermine ainsi une maladie caractéristique, le tétanos cérébral. Ce fait suffirait à renverser l'opinion de M. Wassermann sur l'existence d'une antitoxine tétanique dans le cerveau normal. Comment admettre cette antitoxine qui n'agit pas, même dans le lieu où elle se produirait? En réalité, le mélange de cerveau broyé et de toxine tétanique est inoffensif, parce que le poison adhère à la matière nerveuse, et qu'introduit à cet état, sous la peau des animaux, il ne diffuse pas, mais est englobé par les phagocytes et digéré dans leur intérieur, en même temps que les débris nerveux qui lui servent de support. C'est le cas de la toxine cholérique contenue dans le corps des vibrions ainsi que l'ont montré MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni³.

La fixation quasi immédiate du poison tétanique sur les éléments nerveux permet de limiter l'action de celui-ci à un groupe déterminé de cellules, en le portant directement à leur

1. Ces *Annales*, 1896, p. 257.

2. Ces *Annales*, juillet 1897.

3. Ces *Annales*, février 1898.

contact. On obtient alors une maladie dont les symptômes dépendent des fonctions du territoire intoxiqué.

Ainsi, la toxine injectée en plein cerveau provoque, chez le lapin et chez le cobaye, une maladie caractérisée par une excitation extraordinaire, par des crises convulsives intermittentes, des troubles moteurs et de la polyurie, qui ne rappellent en rien le tétanos ordinaire. Dans ces conditions, le poison n'agit plus sur la moelle épinière, mais sur les centres psychiques et sur les régions motrices du cerveau, qui réagissent à leur façon, et nous voyons évoluer une maladie expérimentale à symptômes variables suivant l'étendue de la région intéressée¹.

M. Tizzoni² et M^{lle} Cattani, en injectant de la toxine tétanique sous la dure-mère d'un lapin, ont observé des manifestations du tétanos cérébral, bientôt suivies de la raideur des membres. Dans ce cas, les expérimentateurs ont eu affaire à un tétanos mixte cérébral et médullaire : ils avaient probablement lésé la surface du cerveau, car M. Vaillard³ et M. Conrad Brunner⁴ ont introduit de la toxine tétanique dans la cavité arachnoïdienne sans déterminer autre chose que des contractures généralisées. Certaines observations de tétanos humain, survenu à la suite de plaies à la tête, relatent des symptômes, comme la paralysie faciale, qui pourraient se rapporter au tétanos cérébral. Mais, cette maladie, si facile à donner expérimentalement, est à peine connue et cependant elle mérite d'être approfondie. Depuis plusieurs mois M. Morax en a entrepris l'étude, à l'Institut Pasteur.

L'introduction de la toxine tétanique dans le cerveau se fait le plus simplement du monde, en pratiquant, au moyen d'un foret, un petit trou dans les os du crâne; un curseur limite la pénétration et évite la blessure de la dure-mère. Il est facile de faire le pertuis au même endroit, de façon à atteindre la même région de l'encéphale dans les expériences comparatives. On enfonce l'aiguille de la seringue en plein dans la substance céré-

1. Nous donnerons à ce tétanos provoqué par l'introduction de la toxine dans le cerveau le nom de tétanos cérébral, pour le distinguer du tétanos céphalique et du tétanos hydrophobique de Rose.

2. TIZZONI et M^{lle} CATTANI. *Archiv. für experimentale Pathologie*. Vol. 27, p. 439. 1890.

3. *Annales de l'Institut Pasteur*.

4. CONRAD BRUNNER, Tétanos céphalique expérimental et clinique, 1894. *Beitrag für klinische Chirurgie*.

brale à une profondeur réglée par un arrêt, et on injecte 1/20 ou 1/10 de c. c., suivant la dilution de la toxine.

Il va sans dire que l'opération par elle-même est inoffensive, que la lésion faite par l'aiguille ne cause aucun accident, et que si l'on injecte de la même manière cinq fois plus d'eau stérilisée, de solution physiologique ou de toxine chauffée à 100°, le lapin n'en souffre à aucun moment ¹.

Dans les heures qui suivent, l'animal se meut avec aisance et mange avec toutes les apparences de la santé. Mais, au bout de 8 à 12 heures, le lapin devient inquiet, change de place à chaque instant, prend une attitude particulière, le train relevé comme s'il ne pouvait s'asseoir complètement. En même temps il paraît en proie à des hallucinations, cherche à cacher sa tête, et, comme pris de terreur, tourne autour de sa cage. Si on le fait sortir, il s'élance haut sur pattes avec une démarche de lièvre. Souvent, à chaque foulée, les pattes postérieures projetées en avant dépassent la tête. Le désir de fuir est très marqué, le lapin parcourt le laboratoire, se réfugie dans les coins et se dresse contre les obstacles. Les émissions d'urine sont nombreuses et abondantes. Des crises convulsives, épileptiformes, surviennent plus ou moins fréquentes, soit spontanément, soit à la moindre excitation. L'animal tombe en grinçant des dents, le cou et les membres convulsés, mordant la litière de sa cage; puis il se redresse et se met à manger pour retomber bientôt.

Parfois, les pattes postérieures sont écartées et malhabiles, et des trépidations musculaires rendent la démarche hésitante.

L'intensité et la durée de la maladie varient suivant la dose de toxine. Avec une quantité un peu forte, 1/10 de c. c. dans certaines expériences, les accès convulsifs étaient incessants et toute la scène évoluait en 12 à 20 heures. Avec des doses plus faibles, l'affection peut durer 3, 5 et même 8 et 15 jours. L'animal a de temps en temps des crises, dans l'intervalle il mange et paraîtrait normal sans son attitude inquiète; il maigrit de plus en plus et succombe.

De toutes petites quantités de toxine donnent un tétanos guérissable, avec tendance à se cacher, petits accès épileptiformes

1. A l'autopsie on ne trouve aucune lésion cérébrale appréciable à l'œil, souvent la trace de l'aiguille n'est plus visible.

passagers et amaigrissement. Même à ce degré, le tétanos cérébral persiste longtemps, un mois et parfois davantage.

A cause du volume du cerveau chez le lapin, il est possible d'introduire la toxine en des points différents. Après une injection dans le cervelet, il survint, au bout de trois jours, de la paralysie du train postérieur, en même temps que des crises convulsives. Pour n'intéresser qu'un groupe de cellules limité, il ne faut employer que très peu de toxine, de façon à ce que l'excès ne diffuse pas. Les poisons qui ont une grande affinité pour les cellules nerveuses, et qui se fixent sur elles, nous fournissent un moyen original d'exploration des divers territoires encéphaliques. Chez les animaux à cerveau plus développé et à facultés mieux différenciées, on obtiendra sans doute des résultats intéressants pour la physiologie.

Le lapin est assez résistant au poison tétanique introduit sous la peau ou dans le sang ; 2 c. c. $1/2$ de notre toxine, mis dans le tissu cellulaire, donnent à un animal de 2 kilos un tétanos ordinaire mortel en quatre jours ; $1/10$ de c. c. dans le cerveau provoque un tétanos cérébral intense, et tue en moins de 20 heures. La résistance du lapin à la toxine tétanique, injectée dans les conditions habituelles, ne tient donc pas à une insensibilité relative des centres nerveux, mais, sans doute, à ce que beaucoup du poison introduit n'arrive pas aux cellules nerveuses et est détruit quelque part dans l'organisme.

Le cobaye qui, à poids égal, prend le tétanos bien plus facilement que le lapin, quand il reçoit la toxine sous la peau, résiste mieux à l'injection intra-cérébrale. A un cobaye de 500 grammes, on donne $1/100$ de c. c. de toxine sous la peau d'une patte postérieure, la contracture apparaît à la 12^e heure et la mort survient vers la 50^e heure ; un autre cobaye du même poids reçoit la même dose dans le cerveau : les premiers symptômes se montrent après 48 heures et la maladie dure 3 jours.

Le tétanos cérébral du cobaye est tout aussi caractéristique que celui du lapin. Point de contractures permanentes, mais des crises convulsives plus ou moins répétées après lesquelles l'animal mange et se meut librement. Le besoin de fuir se manifeste chez ces animaux ; aussitôt qu'on les sort de la cage, ils partent en ligne droite par un mouvement rapide des pattes et comme mus par un ressort, il se heurtent au premier obstacle, tombent en

convulsions, puis se relèvent et reprennent pour un temps leur allure normale. Le tétanos cérébral du cobaye présente aussi tous les degrés d'intensité et peut guérir.

Pour provoquer chez le rat des symptômes saisissants de tétanos cérébral, il faut plus de toxine que pour le tuer par injection sous-cutanée. L'incubation est de quarante-huit heures à trois jours. Si l'expérimentateur n'avait pas la certitude qu'il a injecté du poison tétanique, jamais il ne reconnaîtrait le tétanos dans la maladie qu'il observe. Les manifestations psychiques dominant, le rat est inquiet, attentif : pris, sans cause apparente, de terreurs soudaines, il court follement autour de sa cage. Si on ouvre celle-ci, il bondit sur le plancher, court se réfugier dans un coin, puis, l'accès passé il se laisse prendre et reste calme pendant un certain temps, malgré les excitations. Durant la crise, il semble obéir à une impulsion intérieure, il donne l'idée d'un animal pris de folie, et, en le considérant, on se demande si beaucoup d'affections psychiques ne sont point produites elles aussi par la fixation sur certaines cellules nerveuses de toxines microbiennes élaborées à un moment donné dans l'intestin ou dans quelque autre partie du corps. Cet état peut durer plusieurs jours, le rat cesse de manger et meurt très amaigri. De plus faibles quantités de poison tétanique amènent seulement un état cachectique qui se termine par la mort après un délai variable.

Chez les souris le tétanos cérébral est moins dramatique. La dose de toxine qui, sous la peau, les tuerait en trente à trente-six heures, introduite dans leur cerveau, paraît tout d'abord ne produire aucun effet : plus tard l'animal est stupéfié, lent dans ses mouvements, et meurt amaigri sans contractures.

En résumé, au lieu des contractures permanentes du tétanos ordinaire, nous voyons, dans le tétanos cérébral, de l'excitation, des crises épileptiformes, de la polyurie et des troubles moteurs qui donnent à cette maladie une physionomie facile à reconnaître.

II

TÉTANOS CÉRÉBRAL ET IMMUNITÉ PASSIVE

L'injection dans le cerveau est un moyen d'explorer la sensibilité des cellules nerveuses à la toxine tétanique, et de savoir

ce que devient cette sensibilité chez les animaux immunisés de diverses façons contre le tétanos.

Un animal qui a reçu du sérum antitétanique acquiert l'immunité dite passive, et résiste à des doses plusieurs fois mortelles de toxine mises sous sa peau, dans ses muscles ou dans ses veines. Est-ce parce que ses cellules nerveuses sont devenues insensibles au poison? Pour le savoir, mettons la toxine directement en contact avec elles.

A cinq lapins du même poids, injectons dans le tissu sous-cutané, 5 c. c., 10 c. c., 15 c. c., 20 c. c. de sérum antitétanique.

Un des animaux à 5 c. c. est éprouvé par l'injection hypodermique d'une dose de toxine cinq fois mortelle, il reste bien portant.

Vingt-quatre heures après l'introduction du sérum, les quatre lapins restants reçoivent, en même temps qu'un témoin, 4/10 de centimètre cube de poison tétanique dans le cerveau, c'est-à-dire une dose qui, dans la cuisse d'un lapin neuf de même poids, ne détermine même pas un tétanos local.

Le lendemain le lapin témoin est en proie aux crises convulsives. Les lapins à 10 c. c., à 15 c. c. et à 20 c. c. de sérum sont manifestement pris et leur maladie va en s'accusant. L'animal à 20 c. c. meurt en 48 heures, comme le témoin. Celui à 10 c. c. succombe le quatrième jour et celui à 15 c. c. le sixième jour.

Seul le lapin à 5 c. c. reste bien portant.

Et cependant, le sang de ces animaux qui ont péri est antitoxique; à l'heure de la mort, une goutte de sang du lapin à 20 c. c. suffisait à neutraliser la dose de toxine dix fois mortelle pour une souris.

Une goutte du sang du lapin à 10 c. c., retirée au moment de l'injection intra-cérébrale, est ajoutée à la quantité de poison tétanique capable de donner un tétanos cérébral mortel; le mélange introduit dans le cerveau d'un lapin neuf ne produit aucun effet.

Le mélange de toxine et d'antitoxine est inoffensif pour les cellules nerveuses, et une trace du sang de ces lapins qui meurent dans les accès du tétanos cérébral aurait suffi à détruire le poison tétanique s'il était venu en contact avec lui. Une hémorragie causée par la piqûre, empêcherait l'apparition de la maladie.

C'est ce qui est arrivé sans doute pour le lapin aux 5 c. c. de sérum de l'expérience ci-dessus.

Quand on opère sur un certain nombre d'animaux, il en est toujours quelques-uns qui restent bien portants, car on ne peut constamment éviter un petit épanchement sanguin. Celui-ci se produit même dans tous les cas, et, sur les coupes des cerveaux, le microscope montre des globules sanguins dans la piqûre. On conçoit que cette minuscule extravasation de sang antitoxique suffise parfois pour neutraliser la petite quantité de toxine introduite, surtout chez les lapins qui ont eu des doses énormes de sérum. Il y a donc une limite à l'expérience. En réalité, la portion du poison qui agit est celle qui est pour ainsi dire happée par les cellules. Aussi la maladie est-elle souvent plus lente chez les lapins au sérum, qui se comportent alors comme les lapins neufs qui n'ont reçu que de très petites doses de toxine.

L'expérience manque quelquefois avec les cobayes immunisés par le sérum, parce que leur cerveau est plus vasculaire que celui du lapin, et moins sensible à la toxine tétanique. Pour la réussir, il faut une dose suffisante de poison, inoffensive cependant si elle est mise sous la peau.

Tous ces faits peuvent être aussi constatés avec la toxine diphtérique. Celle-ci est plus rapidement meurtrière, et à plus petites doses, dans le cerveau que sous la peau. Elle détermine en douze heures des paralysies, bientôt suivies de mort. Les lésions ordinaires, à savoir la congestion des capsules surrénales et l'épanchement de sérosité dans les plèvres, se rencontrent chez les cobayes à la suite de l'injection intra-cérébrale. Le poison diphtérique n'a pas seulement de l'affinité pour le système nerveux, mais aussi pour d'autres organes qui dégénèrent sous son action.

Les lapins et les cobayes auxquels on a donné du sérum anti-diphtérique résistent à des doses énormes de toxine mises sous la peau, mais ils périssent si on leur en introduit un peu dans le cerveau. La maladie est alors exclusivement nerveuse; elle dure plus longtemps, et à l'autopsie on ne trouve ni congestion des capsules surrénales, ni exsudat pleural. Tous les organes étaient protégés par l'antitoxine, excepté la cellule nerveuse.

A maintes reprises, nous avons donc produit le tétanos et la diphtérie cérébrale sur des lapins qui avaient reçu jusqu'à

40 c. c. de sérum antitoxique, 48 et 96 heures auparavant, c'est-à-dire après que l'antitoxine avait eu le temps de se répandre partout. Même dans ces conditions, elle ne protégeait pas les cellules nerveuses. Celles-ci n'ont pas pour l'antitoxine la même affinité que pour la toxine. Aussi l'antitoxine tétanique injectée aux animaux reste-t-elle dans le sang, tandis que la toxine en est extraite et fixée par les éléments nerveux. Le contre-poison n'arrive pas au contact du poison, et les deux substances, pourtant si rapprochées, ne se rencontrent pas. Le sérum est efficace contre la toxine mise sous la peau, puisque la majeure partie de celle-ci passera par le sang, mais il est impuissant contre le poison arrivé déjà aux éléments nerveux.

C'est pourquoi, dans le tétanos déclaré, il échoue si souvent. Au moment où on l'emploie, une partie de la toxine est déjà adhérente aux cellules nerveuses; l'antitoxine neutralise bien le poison qui circule encore, mais elle n'atteint pas celui qui est fixé aux éléments de la moelle épinière. Elle limite l'empoisonnement. Si celui-ci est trop avancé, la maladie suivra son cours, car la toxine diffusera de cellule nerveuse à cellule nerveuse à l'abri de l'antidote.

S'il en est ainsi, ce n'est pas dans le sang des tétaniques qu'il faut accumuler l'antitoxine pour les guérir, il faut la mettre là même où progresse la toxine, et préserver les portions vitales de la moelle avant qu'elles soient atteintes.

III

TRAITEMENT DU TÉTANOS DÉCLARÉ

C'est à l'expérience de prononcer.

A 20 cobayes de 400 à 450 grammes on injecte dans une patte postérieure une dose de toxine tétanique mortelle en 70 heures environ.

18 heures après, tous les cobayes ont de la raideur de la patte. A la 24^e heure, ils sont tous tétaniques.

Les 5 plus gros sont conservés comme témoins.

Les 15 autres sont divisés en 3 lots.

Un cobaye du premier lot reçoit, 24 heures après l'injection

de toxine, 1 c.c. de sérum sous la peau. Aux 4 autres on donne, en pleine substance cérébrale, 4 gouttes du même sérum dans chaque hémisphère, soit à peu près un quart de centimètre cube.

On agit de même avec les cobayes du second et du troisième lot, qui sont traités à la 28^e et à la 32^e heure.

Les résultats sont les suivants :

Les 5 cobayes témoins succombent de la 67^e à la 74^e heure.

Les 3 cobayes au sérum sous la peau meurent de la 64^e à la 72^e heure.

Les douze cobayes, au sérum dans le cerveau, ont leur tétanos arrêté. Les contractures restent limitées à une patte ou aux deux pattes postérieures, suivant l'heure de l'intervention. Un mois après, les cobayes sont bien portants, mais les contractures persistent encore.

Sur 45 cobayes, traités à divers moments dans différentes expériences, 35 ont survécu à la suite de l'injection intracérébrale. Sur 17 autres cobayes qui ont reçu le sérum sous la peau à doses beaucoup plus fortes ¹, 2 seulement sont restés vivants. 17 cobayes témoins, auxquels on n'a point donné de sérum, sont tous morts.

On peut donc dire que quelques gouttes de sérum antitétanique dans le cerveau guérissent mieux le tétanos que de grandes quantités introduites dans le sang ou sous la peau. Il ne suffit pas de donner de l'antitoxine, il faut la mettre au bon endroit.

Les cobayes rendus tétaniques au moyen d'échardes peuvent aussi être guéris, de même que les lapins auxquels on a injecté une dose mortelle de toxine dans les muscles.

L'antitoxine portée dans le cerveau protège la moelle supérieure, alors que la moelle inférieure est déjà atteinte par le poison, mais elle ne défait pas les lésions accomplies ; les contractures établies au moment de l'intervention persistent longtemps. Aussi, l'injection intra-cérébrale ne sauve pas tous les animaux tétaniques ; si l'empoisonnement des parties supérieures de la moelle est fait, la mort ne sera pas évitée. Il y a un temps après lequel l'antitoxine ne peut rien, quelle que soit la façon dont

1. Jusqu'à 10 c.c. et 20 c.c. dans certaines expériences.

elle est employée. L'injection intra-crânienne augmente la période d'intervention efficace.

Plus d'un lecteur pensera peut-être que le cerveau est un organe délicat, que la dilacération causée par l'aiguille, que la compression produite par le sérum injecté, sont capables d'amener des accidents pires que ceux du tétanos lui-même. Il n'a qu'à répéter l'expérience ; il se convaincra que, chez les cobayes et les lapins, rien n'est plus facile et moins dangereux que d'injecter dans le cerveau un liquide pur, tel que le sérum antitétanique. Les cobayes supportent aisément huit gouttes en deux piqûres et les lapins 1/2 c. c. Le liquide pénètre, sans doute, dans les ventricules, et la compression détermine des mouvements des pattes chez les cobayes et des mâchoires chez les lapins. Tout rentre bientôt dans l'ordre, et quelques instants après l'animal mange et se meut sans autre gêne que celle de sa patte tétanisée.

Il est bien entendu que nous ne proposons pas d'inonder d'emblée de sérum le cerveau des hommes tétaniques. Il faut avant tout multiplier les essais sur diverses espèces animales, car il se pourrait que sur les chevaux et les moutons, par exemple, le résultat fut différent de celui constaté chez les cobayes. Un animal dont le tétanos serait bulbaire dès le début, ne guérirait peut-être pas mieux par le sérum injecté dans le cerveau que par le sérum injecté sous la peau ¹.

Il n'est question ici que de la guérison des cobayes tétaniques.

IV

TÉTANOS CÉRÉBRAL ET IMMUNITÉ ACTIVE

Les lapins et les cobayes qui ont l'immunité passive prennent le tétanos cérébral quand on leur injecte la toxine dans le cerveau ; en est-il de même des animaux qui ont l'immunité active ?

La question est particulièrement intéressante, car beaucoup de savants sont d'avis que l'antitoxine est élaborée par les

1. L'injection du sérum dans le canal rachidien des lapins nous a donné, jusqu'à présent, de moins bons résultats que l'injection intra-cérébrale.

cellules sensibles à la toxine, et que chaque système qui est impressionné par le poison répond en faisant un contre-poison. L'un de nous a soutenu cette idée à diverses reprises dans son enseignement. L'immunité contre le tétanos, maladie surtout nerveuse, nous apparaissait comme l'accoutumance des cellules nerveuses à la toxine et la production de l'antitoxine était une conséquence de celle-ci.

On sait quelle forme saisissante M. Ehrlich a donnée à cette doctrine. Pour ce savoir, il existerait, dans les cellules nerveuses, comme un groupement central, avec des chaînes latérales auxquelles la toxine, introduite dans le corps, viendrait s'accrocher. Ces chaînes latérales ainsi surchargées constituent l'antitoxine, qui se détache quand elle est surabondante et pénètre dans la circulation.

Si la cellule nerveuse est la source de l'antitoxine, de toutes les cellules du corps elle doit être la mieux protégée contre la toxine.

L'injection intra-cérébrale nous fournit le moyen de voir s'il en est ainsi.

M. Vaillard a bien voulu mettre à notre disposition deux lapins immunisés à divers degrés contre le tétanos, et dont le sérum était antitoxique¹. Après avoir constaté que ces animaux n'éprouvaient aucun effet de l'injection, sous la peau, de 8 c. c. et même de 12 c. c. de toxine tétanique, mortelle à la dose de 2 c. c. pour un lapin neuf de même poids, nous leur en avons introduit dans le cerveau 1/10 de c. c. en même temps qu'à un lapin témoin.

Le lendemain, les lapins immunisés et le lapin neuf ont des signes de tétanos cérébral. Les crises sont intenses et fréquentes chez le témoin qui meurt dans la journée. Les lapins immunisés présentent l'excitation, la démarche caractéristiques, et des accès épileptiformes, répétés les premiers jours, plus rares ensuite. Ils maigrissent, le moins immunisé meurt après 17 jours, et l'autre après 20 jours. Ils se sont comportés comme des lapins neufs qui n'auraient reçu qu'une faible quantité de toxine.

L'expérience est démonstrative, elle prouve que chez un

1. Une goutte de sang du moins immunisé de ces lapins neutralisait une dose de toxine dix fois mortelle pour une souris. On n'a pas déterminé la limite précise du pouvoir antitoxique.

lapin immunisé capable de supporter sans malaise de la toxine à doses massives sous la peau ou dans les veines, capable aussi de fournir une antitoxine active, les cellules nerveuses sont encore sensibles à la toxine.

Comment admettre que ce sont elles qui préparent l'antitoxine?

Il semble plutôt que, pendant tout le cours de l'immunisation, elles n'aient jamais été en contact avec la toxine. L'immunité dans le tétanos ne serait donc point l'accoutumance des cellules nerveuses au poison tétanique.

On pourrait objecter que ce ne sont pas les cellules du cerveau qui prennent la toxine dans les conditions ordinaires, mais celles de la moelle épinière, que chez l'animal immunisé ces dernières seules sont accoutumées au poison et font l'antitoxine, et que s'il est possible de donner le tétanos cérébral aux lapins réfractaires, il est impossible de leur donner le vrai tétanos, le tétanos médullaire.

Pour répondre directement à cette objection, il faudrait porter la toxine dans la moelle, mais il est difficile de le faire chez les petits animaux sans amener des paralysies qui empêchent d'observer les symptômes du tétanos. On ne peut explorer la moelle comme le cerveau. Remarquons, cependant, avec M. Metchnikoff, que l'antitoxine mise dans le cerveau d'un cobaye tétanique se répand jusque dans la moelle et la protège; pourquoi l'antitoxine, si elle existe en tel excès dans la moelle de l'animal immunisé qu'elle passe dans le sang, ne diffuserait-elle pas jusqu'au cerveau?

Nous comptons multiplier ces essais sur les animaux rendus réfractaires au tétanos et à la diphtérie, et voir si les mêmes faits se reproduisent chez ceux qui ont atteint le plus haut degré d'immunisation.

V

TOXINES ET IMMUNITÉ NATURELLE

Certains animaux supportent des doses considérables de toxines microbiennes sans y avoir été graduellement habitués. Ainsi le rat ne souffre nullement d'une dose de poison diphté-

rique qui tuerait plusieurs lapins. On en a conclu que les cellules du rat sont naturellement insensibles à la toxine diphtérique.

Il est facile de vérifier si les cellules nerveuses du cerveau sont dans ce cas. Injectons, dans la substance cérébrale d'un rat, 1/10 de c. c. de toxine diphtérique; cette dose, mise sous la peau d'un autre rat, ne provoque même pas d'œdème local. Cependant, celui qui l'a reçue dans le cerveau est bientôt atteint de paralysie totale. Il reste inerte pendant deux ou trois jours et succombe.

Le cerveau du rat est donc sensible au poison diphtérique, et si cet animal ne meurt pas, à la suite de l'injection de grandes quantités de toxine dans le tissu sous-cutané, c'est que celle-ci n'arrive pas à l'encéphale. Elle est arrêtée quelque part dans le corps. L'immunité naturelle du rat vis-à-vis du poison diphtérique ne tient point à une résistance des cellules nerveuses, mais à quelque autre propriété de l'organisme.

Le lapin passe pour être très réfractaire à l'action de la morphine; une injection hypodermique de 30 centigrammes d'un sel de cet alcaloïde est parfaitement supportée par un animal de moins de 2 kilogrammes. L'introduction d'un seul milligramme de chlorhydrate de morphine dans le cerveau cause à un lapin de même poids des accidents presque immédiats. Les membres sont agités d'un tremblement, la marche est impossible; l'animal reste stupéfié pendant 24 à 30 heures, puis il paraît aller mieux, mais il maigrit et meurt en 4 à 5 jours.

Les cellules nerveuses du lapin ne sont donc pas insensibles à la morphine. Lorsque ce rongeur résiste à l'injection hypodermique d'une grande dose de cet alcaloïde, c'est que celui-ci n'arrive pas jusqu'aux cellules cérébrales.

Les faits que nous venons de rapporter montrent que, dans l'immunité acquise comme dans l'immunité naturelle vis-à-vis de certains poisons du système nerveux, la résistance n'est pas due à une accoutumance ou à une insensibilité des cellules nerveuses, du moins des cellules nerveuses du cerveau. Les toxines introduites sous la peau et dans le sang ne les atteignent pas, malgré qu'elles aient pour elles une affinité manifeste. Ces poisons sont sans doute retenus par d'autres cellules qui exercent un rôle de protection et fabriquent probablement les antitoxines. Quelles sont ces cellules? Peut-être les cellules phagocytaires que l'on voit, en maintes circonstances, capables de détruire les

poisons contenus dans les corps microbiens ? Nous ne pouvons l'affirmer, mais il nous semble que le problème de l'immunité contre les microbes et celui de l'immunité contre les toxines recevront des solutions semblables¹.

1. Voir, dans ce même numéro, METCHNIKOFF, Toxine tétanique et leucocytes.
-

LE MICROBE DE LA PÉRIPNEUMONIE

PAR MM. NOCARD ET ROUX

AVEC LA COLLABORATION DE MM. BORREL, SALIMBENIET DUJARDIN-BEAUMETZ.

La lésion essentielle de la péripneumonie contagieuse des bêtes bovines consiste dans la distension des mailles du tissu conjonctif interlobulaire, par une grande quantité de sérosité albumineuse, jaunâtre et limpide.

Cette sérosité est très virulente.

Inoculons-en une goutte dans le tissu cellulaire sous-cutané d'une vache neuve : après une incubation qui n'est jamais inférieure à huit jours, mais qui peut aller jusqu'à vingt-cinq jours et plus, nous verrons apparaître un engorgement inflammatoire, chaud, tendu, douloureux, dont les dimensions varieront beaucoup, suivant le siège de l'inoculation et aussi suivant les sujets inoculés.

Si la sérosité virulente est déposée sous la peau du tronc, de l'encolure, ou de la partie supérieure des membres, elle provoque, avec une fièvre intense, un engorgement considérable, rapidement envahissant, *souvent suivi de mort*. A l'autopsie, on trouve les mailles du tissu cellulaire distendues par une quantité énorme de sérosité jaune, limpide, çà et là coagulée en masses gélatineuses et tremblotantes; l'exsudation est parfois si abondante qu'on peut recueillir plusieurs litres de sérosité virulente. Si étendue qu'elle soit elle n'envahit jamais les cloisons conjonctives du poumon; on peut trouver un peu d'exsudat séreux dans la cavité pleurale, mais jamais on n'observe de lésions viscérales; la mort est donc bien le résultat d'une intoxication.

Certains sujets résistent : après quelques jours, l'engorgement, toujours chaud, tendu et douloureux, reste stationnaire, puis s'affaisse et disparaît peu à peu sans laisser de traces; ces animaux sont désormais réfractaires aux effets de l'inoculation virulente comme à ceux de la contagion naturelle.

Cette évolution heureuse est la règle quand l'inoculation est faite loin du tronc, à l'extrémité de la queue, par exemple, où la densité des tissus et la température locale peu élevée ne permettent pas une active pullulation du virus. L'engorgement consécutif à l'inoculation est toujours analogue à celui décrit ci-dessus ; mais il reste peu étendu et il disparaît peu à peu, en laissant l'animal réfractaire à la contagion naturelle ou expérimentale.

Parfois, cependant, l'exsudation est si abondante, elle exerce sur le tégument une tension telle, qu'elle entraîne la mortification et la chute d'un tronçon de queue plus ou moins long. Parfois, enfin, mais rarement (une ou deux fois sur cent), l'engorgement, au lieu de rester limité à l'extrémité de la queue, monte rapidement le long de l'organe et envahit le tissu cellulaire de la croupe et du bassin ; la mort s'ensuit d'ordinaire, et les régions envahies se montrent, à l'autopsie, infiltrées d'une quantité considérable de sérosité semblable à celle du poumon dans la maladie naturelle.

La sérosité péripneumonique, si virulente pour les animaux de l'espèce bovine, est sans action sur ceux des autres espèces. La chèvre, le mouton, le chien, le porc, le lapin, le cobaye, les oiseaux de basse-cour, supportent sans aucun dommage l'injection sous-cutanée ou intra-péritonéale de doses massives de sérosité virulente.

Ces faits ont été établis par Willems dès 1850 : il en a déduit les règles d'une prophylaxie efficace. Mais l'inoculation Willemsienne, qui a rendu de grands services, n'est pas sans inconvénients. Elle nécessite le dépôt d'une goutte de sérosité pulmonaire dans le tissu cellulaire de l'extrémité caudale de l'animal qu'on veut immuniser. Or, cette sérosité pulmonaire s'altère avec une extrême facilité ; elle devient rapidement putride, et la putréfaction détruit sa virulence. Il faut donc avoir un poumon frais pour inoculer ; ordinairement on sacrifie un animal péripneumonique au moment de l'opération ; mais, parfois, l'animal abattu n'a qu'une lésion ancienne, où l'exsudat séreux peut avoir perdu sa virulence, quand il ne fait pas entièrement défaut ; parfois, aussi, surtout quand il s'agit de faire des inoculations *vraiment préventives*, on n'a pas de vache péripneumonique à faire abattre.

Un réel progrès a été réalisé le jour où M. Pasteur nous a

appris à recueillir purement la sérosité qui distend les cloisons conjonctives du poumon péripneumonique, et surtout à produire de grandes quantités de sérosité virulente, en inoculant au veau, en région défendue, une goutte de sérosité pulmonaire. Dès lors, il fut possible de faire des provisions de virus et d'en expédier au loin, à mesure des besoins.

Pourtant, le problème n'était pas entièrement résolu : la sérosité péripneumonique, même recueillie purement, perd assez vite sa virulence; après un mois, six semaines au plus, l'inoculation reste ordinairement sans effets. Pour être sûr de pouvoir satisfaire à tous les besoins, il faut donc créer des centres de production de virus où, chaque mois au moins, on inocule de nouveaux sujets. C'est ce qui a été réalisé à grands frais dans un petit nombre de pays¹.

La détermination de l'agent spécifique du virus péripneumonique, son isolement et sa culture constitueraient donc un progrès considérable. Malheureusement tous ceux qui se sont attelés à cette étude — et ils sont légion ! — y ont échoué.

Nous avons, pour notre part, fait de nombreuses tentatives, et depuis bien longtemps ! Elles sont toutes restées infructueuses. — Quand elle a été recueillie purement, dans les sacs lymphatiques périlobulaires ou sous-pleuraux, la sérosité péripneumonique la plus virulente peut êtreensemencée *dans tous les milieux usuels*, à l'air ou dans le vide, sans jamais donner aucune culture. De même on ne réussit pas à y colorer, par les procédés connus, aucun élément microbien.

Nous avons donc renoncé à toute tentative de culture quand parut le Mémoire de MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni² sur la toxine et l'antitoxine cholérique. Les résultats que leur avait donnés l'emploi des cultures *in vivo*, à l'aide de sacs en collodion, nous rendit l'espoir du succès.

Nous rappellerons, en quelques mots, les principes et la technique de cette ingénieuse méthode de culture.

On prépare de petits sacs de collodion à paroi très mince : après les avoir stérilisés à l'autoclave, on y introduit quelques centimètres cubes de bouillon,ensemencé au préalable avec une trace du liquide virulent à étudier ; on les ferme exactement ;

1. M. Loir a établi un pareil service en Australie.

2. *Annales de l'Institut Pasteur* 1896, page 237.

puis on les introduit dans le péritoine d'un animal neuf, cobaye, lapin, chien, mouton, vache, etc... On apprend vite à exécuter purement toutes ces manipulations, et, pas un instant, l'animal ne paraît souffrir, soit de l'opération, soit de la présence des sacs dans la cavité péritonéale.

Après un temps variable depuis quelques jours jusqu'à plusieurs mois, suivant la nature du microbe étudié, on sacrifie l'animal; on trouve le sac logé en quelque coin de la cavité péritonéale, enveloppé d'une couche plus ou moins épaisse de fibrine et de cellules, ou de tissu fibreux jeune, dont on l'énuclée aisément.

Quand l'animal d'expérience et le liquide de culture ont été convenablement choisis, on obtient des résultats surprenants dont, pourtant, l'interprétation est aisée.

La paroi de collodion offre une barrière infranchissable aux microbes comme aux cellules; les microbes ne peuvent sortir du sac, mais ils peuvent s'y multiplier en toute sécurité, car, les cellules ne pouvant y pénétrer, ils sont à l'abri de la phagocytose. D'autre part, cette paroi impénétrable aux microbes et aux cellules est perméable aux liquides comme aux substances dissoutes; elle forme une membrane osmotique; à son niveau s'établissent des échanges qui modifient profondément la composition primitive du liquide emprisonné; des substances élaborées par le microbe peuvent diffuser au dehors et, quand elles sont suffisamment actives ou l'animal suffisamment sensible, elles peuvent entraîner la mort du sujet ou des accidents d'intoxication plus ou moins graves, sans qu'un seul microbe ait envahi les tissus. En tout cas, les conditions réalisées dans le sac sont favorables à la culture, l'auto-intoxication microbienne se trouvant diminuée, sinon supprimée; enfin, des produits venus de l'organisme du sujet pénètrent dans le sac, qui peuvent être utiles au microbe; — c'est le cas le plus fréquent; aussi, quand on ouvre le sac, y trouve-t-on d'ordinaire une culture d'une richesse invraisemblable.

« Ce procédé, disent les auteurs, est très commode pour conserver les microbes fragiles et il réussit avec beaucoup d'espèces. »

Peut-être réussirait-il avec le virus péripneumonique? L'événement confirma nos prévisions.

Des sacs de collodion, remplis de bouillonensemencé. au

préalable, avec une trace de sérosité péricapneumonique, fermés avec soin et insérés dans la cavité péritonéale de lapins, contiennent, après 15 à 20 jours, un liquide opalin, un peu louche, légèrement albumineux. Ce liquide ne renferme ni cellules, ni bactéries cultivables sur les milieux usuels. En revanche, l'examen microscopique y montre, à très fort grossissement (environ 2,000 diamètres) et à un puissant éclairage, une infinité de petits points réfringents et mobiles, d'une si grande ténuité qu'il est difficile, même après coloration, d'en déterminer exactement la forme. Si on a eu le soin d'insérer dans le péritoine du même lapin un deuxième sac de collodion renfermant du bouillon, *identique, mais non ensemencé*, on peut s'assurer que les modifications éprouvées par le liquide du premier sac ne sont pas dues purement et simplement aux échanges osmotiques qui se sont opérés au niveau de la paroi; on constate, en effet, que le liquide du sac *témoin* a conservé sa transparence et sa limpidité primitives.

En réalité, les points mobiles et réfringents du liquide ensemencé, si nombreux qu'en dépit de leur extrême finesse ils ont rendu ce liquide opalescent, sont des êtres vivants qui ont pullulé à la faveur des modifications subies par le liquide de culture et grâce à l'obstacle opposé par la paroi de collodion à l'action phagocytaire.

Ce qui le prouve, c'est que si l'on insère dans le péritoine d'un deuxième lapin deux sacs de collodion, ensemencés, le premier avec une trace du liquide opalin ainsi obtenu, le deuxième avec plusieurs gouttes du même liquide, *préalablement chauffé*, celui-ci se comporte identiquement comme le sac *témoin* de tout à l'heure; son contenu reste limpide et transparent, tandis que l'autre présente bientôt l'opalescence et les innombrables points réfringents décrits plus haut : le chauffage avait tué les germes ensemencés.

Avec le liquide opalin de cette deuxième culture, on peut ensemençer de nouveaux sacs qu'on insère dans le péritoine d'un troisième lapin, et ainsi successivement; on obtient toujours des résultats identiques. Mais il est prudent de faire plusieurs sacs pour chaque passage, la rupture du sac se produisant assez fréquemment¹.

1. Le sac de collodion peut être remplacé, et souvent avec avantage, par un

Le plus souvent les lapins sont très amaigris au moment où on les sacrifie; parfois même ils succombent avant le jour fixé pour l'autopsie; ils sont alors dans un état de cachexie profonde; ils n'ont plus que la peau et les os; l'autopsie ne révèle pourtant aucune lésion organique appréciable; le sang et la pulpe des parenchymes, ensemencés dans des milieux variés, même en sacs de collodion, ne donnent pas de culture; il s'agit donc, selon toutes probabilités, d'une intoxication due à la diffusion, en dehors du sac, de produits élaborés par le microbe; on ne peut en tout cas les attribuer à des troubles digestifs (ou autres) qu'aurait provoqués la présence du sac, corps étranger: quand le bouillon n'a pas été ensemencé, les lapins peuvent recevoir plusieurs sacs et les conserver plusieurs mois, sans présenter le moindre malaise, sans perdre un gramme de leur poids. Il nous a paru d'ailleurs que ces accidents étaient d'autant plus accusés et la cachexie d'autant plus profonde que les sacs introduits après ensemencement étaient plus nombreux, d'une capacité plus grande ou que la culture effectuée était plus riche. — Voilà donc un nouvel exemple d'un animal très sensible aux toxines d'un microbe contre lequel il est pourtant tout à fait réfractaire.

Nous avons essayé plusieurs fois d'obtenir des cultures en sacs chez le cobaye; nous n'y avons jamais réussi: même après six semaines de séjour dans le péritoine du cobaye, le liquide le plus largement ensemencé est retrouvé aussi limpide qu'au début.

Il s'agit donc bien d'un microbe spécial qui a pullulé en cultures successives dans le milieu que les échanges osmotiques ont créé, chez le lapin, à l'intérieur du sac de collodion ou de roseau.

Ce microbe si particulier est-il bien l'agent de la virulence péripneumonique?

L'inoculation permet de répondre affirmativement.

On trouvera à la fin de ce travail l'observation détaillée de cinq vaches bretonnes chez lesquelles l'inoculation d'une petite

segment plus ou moins long de la fine membrane tubulaire qui tapisse la cavité centrale du roseau; M. Metchnikoff a montré que cette membrane est impénétrable aux microbes et aux cellules; elle est au contraire très perméable aux liquides et aux substances dissoutes; elle est aussi très résistante.

quantité de culture en sacs a provoqué le développement d'un engorgement péripneumonique absolument caractéristique.

L'une de ces vaches (n° 1) a succombé avec une infiltration œdémateuse formidable ; les quatre autres ont résisté. Deux de celles-ci (n°s 2 et 3), réinoculées en région défendue avec une forte dose (1 c. c.) de sérosité pulmonaire, n'ont manifesté absolument aucun symptôme local ou général, tandis qu'une vache *neuve* (n° 4) inoculée en même temps qu'elles, à titre de *témoin*, avec 10 gouttes de la même sérosité, succombait vingt-deux jours après l'inoculation.

Une troisième vache (n° 5) réinoculée après quatre mois avec 1 c. c. de sérosité pulmonaire provenant d'une lésion suraiguë, n'a présenté ni fièvre, ni lésion locale.

La quatrième (n° 6) n'a pas encore été réinoculée.

*
* *

Comme nous le disions plus haut, la culture extraite d'un sac de collodion ou de roseau, après 15 à 20 jours de séjour dans le péritoine d'un lapin, si riche qu'elle soit, ne donne aucune culture quand on la réensemence *in vitro*, à l'air ou dans le vide, dans l'un quelconque des milieux, liquides ou solides, ordinairement usités en bactériologie. — On peut cependant obtenir des cultures à peu près semblables à celles des sacs. Mais il faut, pour cela, employer comme liquide de culture du bouillon stérile, non ensemencé, qu'on a fait séjourner pendant quelques semaines, à l'intérieur de sacs de collodion, dans le péritoine d'une vache ou d'un lapin. Ce bouillon, quoique non ensemencé, se modifie, lui aussi, à la faveur des échanges qui s'opèrent à travers la paroi du sac ; il devient légèrement albumineux ; il acquiert surtout la faculté de pouvoir servir à la culture, *in vitro*, du microbe péripneumonique.

Une seule fois nous avons obtenu, par l'ensemencement de quelques gouttes de sérosité péripneumonique dans du bouillon peptonisé fraîchement préparé, une culture analogue à celle des sacs. Tout au moins, le bouillon ensemencé présentait, après 72 heures de séjour à l'étuve, la très légère opalescence, et les petits grains mobiles et réfringents qui caractérisent cette culture. Mais il ne nous fut pas possible de reproduire l'expérience,

ni même d'obtenir une seconde culture en partant de celle que le hasard nous avait fournie.

Pourtant cette observation nous confirmait dans l'idée que le virus péri-pneumonique peut être cultivé en dehors de l'organisme.

Il fallait donc trouver un milieu de culture favorable. Nous y sommes parvenus après de longues recherches. Le liquide qui nous a donné les meilleurs résultats est constitué par l'addition d'une petite quantité de sérum de lapin ou de vache à la solution de peptone, préparée par M. Louis Martin pour obtenir la toxine diphtérique¹. La proportion de sérum ne doit pas dépasser 1/25 (4 gouttes environ pour 5 c. c. de solution). Une plus forte proportion de sérum donne au liquide une opalescence qui empêche de reconnaître le début de la culture. On n'a pas de culture si l'on emploie une solution de peptone de Witte ou de Chapoteaut; enfin la culture ne se fait pas en présence de gaz inertes ou dans le vide.

Le bouillon Martin-sérum ne permet pas seulement d'entretenir la culture mise en train par le passage en sacs de collodion ou de roseau; il peut aussi donner une culture d'emblée, quand on l'ensemence avec une trace de sérosité naturelle.

La culture *in vitro* du microbe de la péri-pneumonie constitue un gros progrès; on va pouvoir étudier sa toxine, essayer de modifier sa virulence; elle présente déjà cet avantage de conserver intacte la virulence péri-pneumonique, tandis qu'il nous a semblé que les passages successifs par l'organisme du lapin l'atténuent sensiblement. Mais le degré de réceptivité pour le virus péri-pneumonique est si variable, même chez des individus de même âge et de même race, que nous n'osons pas être très affirmatifs. Cette question de l'atténuation du virus ne pourra être résolue que par un grand nombre d'expériences.

Quant au premier point (conservation de la virulence par les cultures successives *in vitro*), il est nettement établi par l'observation des vaches n° 7 et n° 8 qu'on trouvera ci-après: l'un de ces animaux, inoculé le 26 février 1898 avec 10 gouttes d'une 6^e culture, a succombé le 19 mars avec un engorgement œdémateux énorme, en tout semblable à ceux que provoque l'inoculation de la sérosité pulmonaire la plus virulente; l'autre, in-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 janvier 1898.

jecté le 19 mars avec 1 c. c. d'une dixième culture, tombe malade neuf jours après. La fièvre est prononcée et, au point d'inoculation, il se forme un œdème en même temps que l'on constate une zone de matité dans les poumons.

*
* *

La découverte de l'agent de la virulence péripneumonique n'offre pas seulement l'intérêt de la difficulté vaincue; sa portée est plus haute. Elle donne l'espoir de réussir également dans l'étude de tels autres virus dont le microbe est resté jusqu'à présent inconnu.

Ce qui rendait si difficile la détermination de ce microbe, c'est, d'une part, son extrême ténuité; c'est, d'autre part et surtout, les conditions si étroites de sa culture en milieu artificiel.

Or, il est bien permis de concevoir l'existence de microbes plus petits encore, lesquels, au lieu de rester *en deçà* des limites de la visibilité, comme c'est le cas pour celui-ci, seraient *au delà* de ces limites; en d'autres termes, on peut admettre qu'il existe des microbes invisibles pour les yeux de l'homme.

Eh bien! même pour ces microbes, l'étude reste possible, à la condition de trouver un milieu qui soit favorable à leur culture. Il faudra même, dans ces tentatives de culture, ne pas s'en tenir, pour juger de l'échec ou de la réussite, aux modifications survenues dans l'aspect ou dans la transparence du milieu. La culture du microbe de la péripneumonie est abondante; pourtant, elle ne provoque qu'un très léger louche, une opalescence à peine sensible du liquide; on est souvent obligé, pour se convaincre de la réalité de la culture, d'examiner comparativement, à côté d'elle, un tube de même bouillon non ensemencé. On peut donc admettre la possibilité d'une culture microbienne ne modifiant pas d'une façon appréciable l'aspect et la limpidité du milieu. Dès lors, dans l'hypothèse où ce même microbe serait de ceux qui sont au delà des limites de la visibilité, le seul critérium de sa présence et de sa multiplication dans la culture serait l'inoculation.

Déjà, peut-être, certains expérimentateurs ont-ils obtenu de telles cultures; mais ils les auront méconnues parce que, le

liquide ayant conservé sa limpidité, ils auront jugé inutile de l'inoculer.

Dans cet ordre d'idées, la culture *in vivo*, à la faveur des sacs de collodion ou de roseau, nous rendra sans doute encore des services.

CONCLUSIONS

L'agent de la virulence péripneumonique est constitué par un microbe d'une extrême ténuité; ses dimensions, très inférieures à celles des plus petits microbes connus, ne permettent pas, même après coloration, d'en déterminer exactement la forme.

Ce microbe cultive aisément dans les sacs de collodion ou de roseau insérés dans le péritoine du lapin;

Il ne donne pas de culture quand on l'ensemence *in vitro* dans les milieux ordinairement usités;

Au contraire, il cultive aisément, quand on l'ensemence dans le bouillon-peptone de Martin, additionné de sérum de vache ou de lapin, dans la proportion d'une partie de sérum pour vingt parties de bouillon.

APPENDICE

Première expérience.

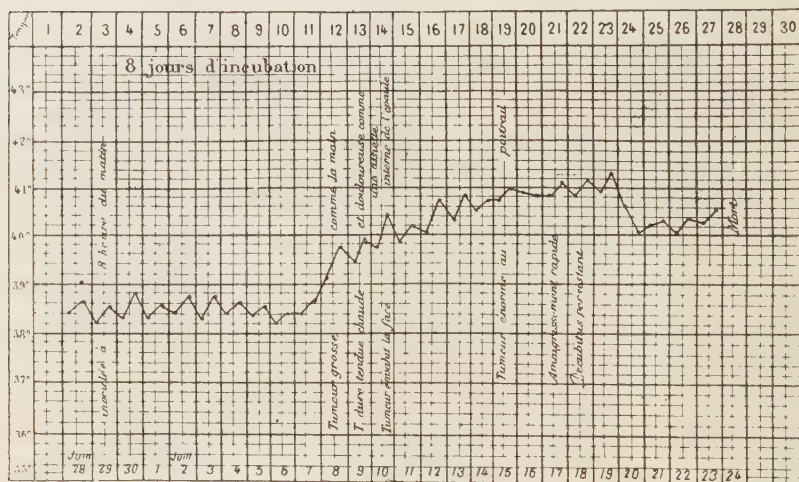
Le 16 mai 1896, à 8 heures du matin, on sacrifie une vache flamande, atteinte de péripneumonie aiguë; cette vache a été envoyée le 14 mai, au service de police sanitaire de l'École d'Alfort, par M. Redon, vétérinaire délégué du 2^e secteur, comme sujet d'études.

A l'autopsie, hépatisation suraiguë de presque tout le poumon droit; la lésion n'a épargné que le lobe antérieur et le bord supérieur de l'organe. Pas d'épanchement dans le sac pleural. Pleurésie sèche sur toute la partie hépatisée.

Une quantité énorme de sérosité jaunâtre et limpide distend les sacs lymphatiques périlobulaires et sous-pleuraux. En certains points, la plèvre est soulevée par de véritables lacs de sérosité; on en recueille *purement*, sans la moindre difficulté, plus de 20 c. c., répartis en 50 tubes effilés flambés.

Le 2 juin 1896, on prépare deux sacs de collodion qu'on remplit de bouillon-peptoneensemencé avec une trace de sérosité recueillie le 16 mai (une gouttelette pour 10 c. c. de bouillon). La sérosité de la pipette qui a servi à cette opération, ensemencée sur gélose et sur bouillon et mise à l'étuve, n'a donné aucune culture. Les deux sacs de collodion, fermés exactement, sont insérés dans le péritoine de deux lapins.

Ces lapins sont sacrifiés le 27 juin; ils sont maigres, mais



N° 1. — Génisse Bretonne, 10 mois, inoculée le 29 juin 1896 avec 5 gouttes de culture péripneumonique en sac de collodion.

encore vigoureux. Les sacs de collodion sont intacts; ils renferment un liquide opalin, un peu louche, légèrement albumineux, où fourmillent une infinité de petits points réfringents, mobiles, si petits qu'on ne peut les distinguer qu'à un très fort grossissement (environ 2,000 diamètres), sans pouvoir en déterminer la forme.

Le 29 juin, à 8 heures du matin, j'inocule une génisse bretonne âgée de 10 mois (vache n° 1), par injection sous-cutanée en arrière de l'épaule gauche, avec cinq gouttes du liquide opalin extrait le 27 d'un sac de collodion. Ces cinq gouttes de culture ont été diluées au préalable dans 2 c. c. de bouillon stérilisé.

Jusqu'au 7 juillet on n'observe rien d'anormal sur la génisse

inoculée ; elle conserve sa gaieté et son appétit ; sa température oscille autour de 38°5 comme avant l'injection.

Le 8 juillet, la température est de 39°1 le matin, 39°7 le soir ; à compter de cette date, elle s'élève lentement et graduellement pour atteindre, le 19 juillet, 41°3.

Le 7 juillet, on notait déjà un petit engorgement au niveau de l'injection ; sur une surface large comme la paume de la main, la peau est soulevée ; elle a perdu de sa souplesse ; elle est un peu chaude et sensible. Ces caractères s'accroissent rapidement ; la tuméfaction s'accroît dans tous les sens ; dès le 10 juillet, elle a plus de 25 centimètres de diamètre : elle est dure, tendue, très douloureuse ; l'animal se défend de la corne et du pied contre les attouchements. Un bourrelet saillant marque son contour.

L'engorgement s'accroît rapidement en avant, en arrière et en bas ; il gagne sous l'épaule qu'il écarte du tronc et qu'il immobilise presque entièrement ; il s'étend sous le ventre jusqu'à la mamelle ; enfin, dès le 16 juillet, il forme au fanon une tumeur œdémateuse, chaude, tendue et douloureuse, du volume de la tête. Peu à peu le bras et l'avant-bras s'engorgent, et la légère pression provoque une vive douleur dont la génisse témoigne par une plainte sourde et prolongée.

L'appétit, qui s'était maintenu jusque vers le 12 juillet, diminue peu à peu ; à compter du 18 juillet, la bête refuse tout aliment.

Le 19 juillet, la bête est couchée sur la table d'opérations ; après cautérisation profonde de la peau, on recueille purement, à l'aide de tubes effilés flambés, une grande quantité de sérosité limpide, légèrement ambrée ; la pression est telle qu'il n'est pas besoin d'aspirer ; le liquide jaillit dans la pipette jusqu'au tampon de ouate ; après l'opération, un filet de sérosité s'écoule par chaque piqûre, imprègne la litière et forme bientôt un véritable ruisseau.

Les jours suivants, l'animal reste étendu sur la litière, incapable de se relever ou même de se tenir debout ; il meurt dans la nuit du 23 au 24 juillet.

A l'autopsie, on constate l'existence d'une infiltration œdémateuse énorme, occupant toute la face droite et toute la partie inférieure du corps, depuis la région de l'auge jusqu'aux mamelles.

Au fanon, elle forme une masse plus grosse que la tête de la génisse; le membre antérieur droit est soulevé, écarté du tronc et infiltré dans toute sa hauteur; le bras et l'avant-bras sont doublés d'épaisseur, en dépit de la résistance opposée par les aponévroses; le tissu cellulaire est envahi jusqu'au voisinage de l'os. Chaque coup de scalpel fait jaillir des flots de sérosité.

Le tissu conjonctif est comme gélatineux; ses mailles sont distendues par une masse de sérosité limpide, un peu ambrée. Au niveau de l'épaule et du bras, l'infiltration conjonctive a envahi jusqu'au tissu interfasciculaire, en sorte que, sur la coupe, le muscle présente un aspect cloisonné, comme scléreux; seulement, les cloisons conjonctives, au lieu d'être fibreuses, sont œdémateuses; entre elles, le tissu propre du muscle a une teinte pâle, lavée, et sa consistance est friable.

Cet aspect se retrouve identique dans les intercostaux; l'infiltration séreuse s'est propagée jusqu'au tissu conjonctif sous-pleural qui forme comme un matelas épais et fluctuant. On le retrouve également, mais moins intense, dans le tissu cellulaire du médiastin antérieur. Le sac pleural renferme également deux litres de sérosité jaune, un peu roussâtre.

Enfin, les deux lobes pulmonaires sont sains; il n'y a pas trace d'infiltration interstitielle ou sous-pleurale.

*
* *

On pourrait croire que le résultat de cette expérience tient à ce que l'on a inoculé une simple dilution du virus; ce n'est pas soutenable. Le bouillon primitif a étéensemencé avec une goutte de sérosité sous-pleurale, soit 1/20 de c. c. pour 10 c. c. de bouillon; la dilution était donc à 1/200.

On a inoculé cinq gouttes du liquide du sac dilué au 1/200, soit un c.c. d'une dilution au 1/800; l'inoculation a été faite quarante jours après la récolte du virus, c'est-à-dire à une époque où d'ordinaire cette sérosité a perdu sa virulence; notons, en outre, que pendant vingt jours la sérosité diluée à 1/200 a supporté une température voisine de $+40^{\circ}$ (dans le péritoine du lapin), conditions éminemment défavorables à la conservation de la virulence; rappelons, enfin, que l'incubation a été très courte et la marche de l'infection très rapide, et nous concluons que les résultats observés sont bien dus au microbe

cultivé et non à une simple dilution du virus péripneumonique.

Au surplus, les expériences ci-après lèvent tous les doutes à cet égard.

Deuxième série d'expériences.

Le 19 juillet, on recueille purement une grande quantité de la sérosité qui distend le tissu conjonctif de la région costale gauche de la génisse dont il vient d'être question.

Le 1^{er} août, trois sacs de collodion reçoivent : l'un, du bouillon neuf nonensemencé (servira de témoin); le deuxième, du même bouillon auquel on a ajouté 1/10^e de la sérosité recueillie le 19 juillet; le dernier, une dilution au 1/1000 de la même sérosité. Les deux tubes de bouillonensemencé, qui ont servi à remplir les sacs, mis à l'étuve, restent stériles. Les deux premiers sacs de collodion sont insérés dans le péritoine d'un lapin (*b.* 116); le troisième dans le péritoine d'un autre lapin (*c.* 135).

Les deux lapins sont sacrifiés le 17 août. Les deux sacs du lapin *b.* 116 sont intacts; le sac *témoin* (bouillon nonensemencé) est absolument limpide; l'autre est fortement louche; le liquide fourmille des petits points réfringents et mobiles déjà vus précédemment. Le sac du lapin *c.* 135 renferme un liquide opalin, moins louche que le précédent; il renferme également un grand nombre de microbes.

Avec la culture du lapin *b.* 116, on refait deux dilutions qu'on met en sacs de collodion : l'un des sacs (dilution au 1/100) est mis dans le péritoine d'un lapin (*i.* 41); l'autre (dilution au 1/1000) est déposé dans le péritoine du lapin (*i.* 79).

Ces deux lapins sont sacrifiés le 1^{er} septembre; le contenu des deux sacs est louche et plein des points réfringents décrits plus haut. Le 2 septembre, le liquide du sac du lapin *i.* 79 est inoculé à une vache bretonne neuve (vache n° 2); l'autre sert à faire deux nouveaux sacs insérés dans le péritoine de deux lapins : n° 48 (dilution au 1/200) et n° 92 (dilution au 1/500).

Le lapin n° 92 meurt le 9 septembre, cachectique, sans lésions viscérales apparentes; le sac est intact, le liquide louche ne renferme rien autre chose que les points réfringents habituels. On en fait une dilution au 1/60 qu'on insère (en deux sacs) dans le péritoine du lapin n° A. 357. — Disons tout de suite qu'à l'au-

topsie de ce lapin, les deux sacs ont été trouvés rompus et que cette série de passages a été ainsi interrompue.

Le lapin n° 48 est sacrifié le 18 septembre, il est très maigre ; le sac, intact, renferme un liquide très louche, plein des points réfringents habituels ; on en fait deux nouveaux sacs (dilution au 1/200) insérés dans le péritoine des lapins B. 833 et B. 831. Le reste de la dilution, mis à l'étuve, reste stérile.

Le lapin B. 833 meurt le 29 septembre au matin, sans cause apparente, cachectique ; son sac est intact : le liquide, très opalin, renferme uniquement les petits grains réfringents habituels ; on le conserve en tubes scellés jusqu'à l'autopsie du lapin B. 831.

Celui-ci est sacrifié le 6 octobre. Il est très maigre, mais encore vigoureux. Le sac intact renferme très peu d'un liquide très trouble : à côté des petits points réfringents habituels, on trouve, en assez grand nombre, des coccobacilles analogues à celui du choléra des poules, mais plus petits ; il n'y a point de cellules blanches ; il s'agit vraisemblablement d'une impureté introduite au moment où l'on a rempli et fermé le sac de collodion.

Le 8 octobre, on injecte 1 centimètre cube de la culture du lapin B. 833, sous la peau, en arrière de l'épaule d'une vache bretonne (vache n° 3).

Voici l'observation résumée des deux vaches inoculées aux cours de cette série d'expériences :

Vache n° 2 (a reçu, le 2 septembre, 1 centimètre cube d'une deuxième culture en sac, représentant une dilution à 1/10.000 de la sérosité recueillie sur la génisse n° 2, le 19 juillet 1896).

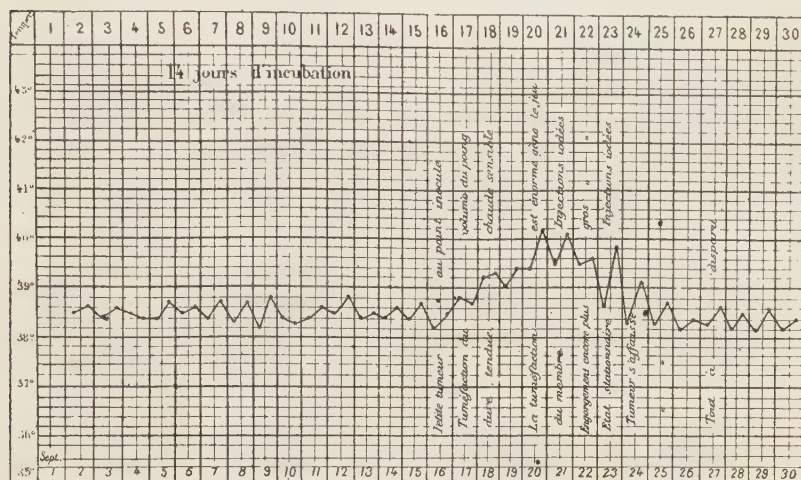
Jusqu'au 15 septembre, cette vache ne présente rien d'anormal ; le 16, on note au point d'inoculation une tuméfaction dure et sensible, du volume d'une mandarine ; température encore normale.

Le 17, la tuméfaction s'est élargie ; elle est tendue, chaude et très douloureuse.

Le 18, elle mesure plus de 20 centimètres de diamètre ; la température s'élève à 39°3.

Le 20, l'engorgement, très tendu, a gagné l'épaule dont elle gêne le fonctionnement ; la température est à 40°2 ; l'animal est triste et laisse une partie de sa ration ; on fait des injections d'eau iodée dans le bourrelet œdémateux qui marque le contour de la tumeur.

Jusqu'au 23, l'état reste le même, toujours inquiétant; on continue les injections iodées. A compter du 24, la tumeur s'affaisse, la température tombe, l'animal reprend son appétit et sa gaieté. Le 27, tout est rentré dans l'ordre.



N° 2. — Vache Bretonne, 6 ans, inoculée le 2 septembre 1896, avec 10 gouttes de culture en sac du lapin n° 79 (Dilution au 110.000).

Vache n° 3 (a reçu, le 8 octobre, 1 c. c. d'une 5^e culture en sac, représentant une dilution à 1/40,000,000 de la sérosité recueillie le 19 juillet).

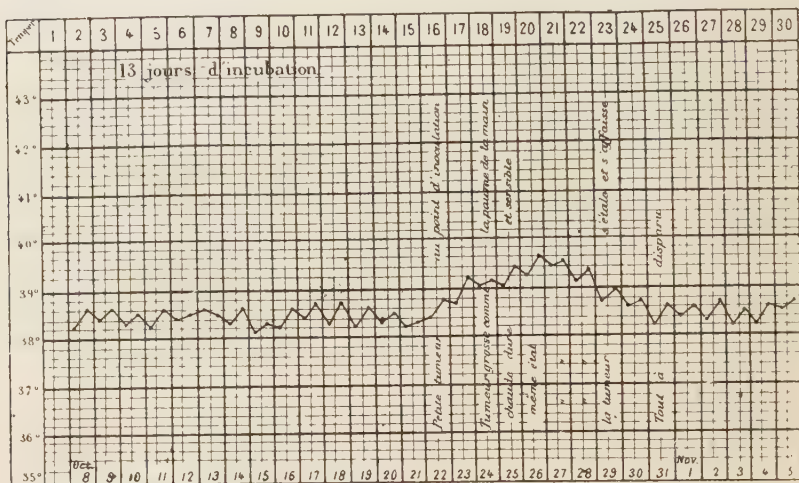
Cette vache n'a rien présenté d'anormal jusqu'au 21 octobre. Le 22, on observe, au point d'inoculation, une tuméfaction dure et sensible, du volume d'une noix : le 23, la nodosité est environnée d'un œdème mou, assez étendu; la température est à 39°2; le 24, tuméfaction large comme la paume de la main, tendue, chaude et douloureuse; le 26, l'engorgement, toujours très sensible, s'est encore étendu en surface; température 39°6; les jours suivants, l'état reste stationnaire, puis tout s'affaisse, se résorbe, la température revient à la normale; le 31, tout avait disparu.

*
* *

Si les accidents observés sur les vaches n°s 2 et 3, consécutivement à l'inoculation des cultures en sacs de collodion, étaient bien de nature péri-pneumonique, ces vaches devaient avoir

l'immunité contre la maladie naturelle et contre l'inoculation de la sérosité virulente. Il fallait s'en assurer. L'expérience ci-après confirma ces prévisions :

Le 11 décembre 1896, M. Dervaux, d'Armentières, envoie à l'École d'Alfort les deux poumons d'un bovidé péripneumonique; le lobe droit a sa moitié postérieure envahie par une hépatisation récente; le tissu est gorgé de sérosité jaunâtre et limpide; on en recueille purement quelques centimètres cubes qui servent à



N° 3. — Vache bretonne, 5 ans, inoculée le 8 octobre 1896, avec un centimètre cube de culture en sac du lapin B. 833 (Dilution à 140,000,000)

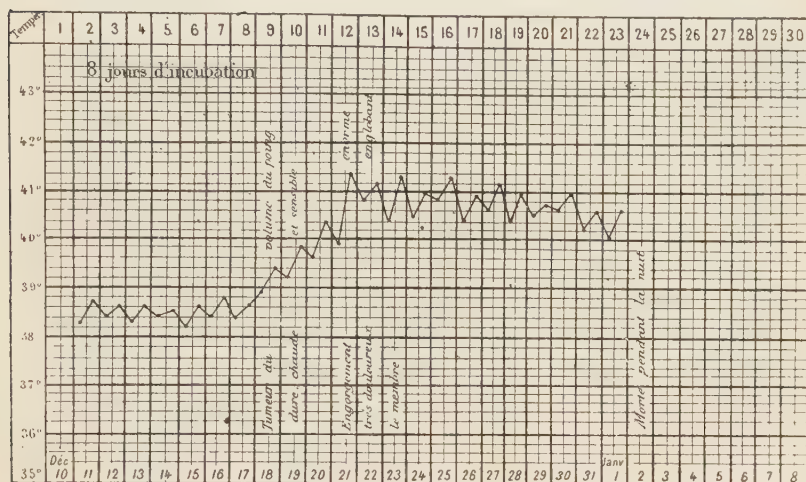
inoculer, par injection sous la peau, en arrière de l'épaule, les vaches n°s 2 et 3 (dont chacune reçoit vingt gouttes de sérosité) et la vache n° 4 (normande, dix-huit mois, actinomycose de la mâchoire), laquelle servira de *témoin* et reçoit seulement dix gouttes de sérosité.

Tandis que les vaches n°s 2 et 3 ont supporté l'injection sans rien présenter d'anormal, ni engorgement ni fièvre même passagère, la vache *témoin* succombait le 22^e jour avec un engorgement considérable renfermant plus de dix litres de sérosité. — L'incubation n'avait été que de huit jours; c'est le 18 décembre que la fièvre s'allumait et qu'apparaissait la tumeur œdémateuse au point d'inoculation. — Ci-joint le tracé relatif à la vache n° 4.

Troisième série d'expériences.

Le 9 mars 1897, M. Borrel recueille purement de la sérosité sous-pleurale, fournie par une vache abattue à Grenelle et mise à sa disposition par M. Martel.

Le 12 mars, on prépare deux sacs de collodion qu'on emplit avec une dilution de sérosité dans du bouillon-peptone, dilution faite au 1/1000. Un des sacs est mis dans le péritoine d'un lapin, l'autre dans le péritoine d'un cobaye.



N° 4. — Vache normande, 18 mois (actinomycose), inoculée le 11 décembre 1896 avec 10 gouttes sérosité pulmonaire.

Le 4 avril, on sacrifie les deux animaux : le sac du cobaye est plein d'un liquide transparent, limpide; — le lapin, très amaigri, donne un sac un peu flasque, renfermant un liquide opalescent où fourmillent les petits grains réfringents habituels. — Avec la culture du lapin, on ensemeince du bouillon dont on fait une dilution au 1/100 et une autre au 1/1000; on en emplit deux sacs qu'on insère dans le péritoine de deux nouveaux lapins.

Le 28 avril, les deux lapins sont sacrifiés; la culture s'est faite dans les deux sacs, identique aux précédentes et très riche.

Le 29 avril, on injecte dix gouttes de la dilution au millième, sous la peau, en arrière de l'épaule gauche, à une vache bretonne, âgée de huit ans (vache n° 5).

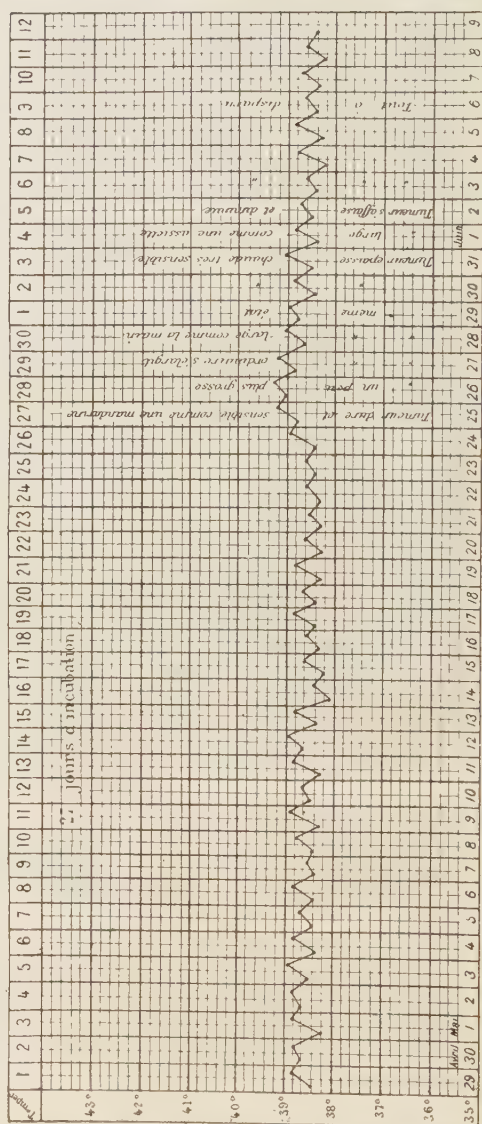
En voici l'observation résumée :

Jusqu'au 24 mai, tout reste normal ; pas de fièvre, pas de lésion locale.

Le 25 mai, vingt-sept jours après l'inoculation, une tumeur, du volume d'une mandarine, saillante, dure, sensible, se montre au niveau du point inoculé ; cette tumeur s'étale peu à peu les jours suivants, toujours tendue et douloureuse. Le 31 mai, elle a les dimensions d'une assiette, s'étend sous l'épaule, dont elle gêne les mouvements ; elle est toujours très sensible ; la vache se défend de la corne et du pied contre tout attouchement. A partir de ce moment, la tumeur s'affaisse rapidement.

Le 6 juin, tout a disparu.

Voir ci-contre le tracé de sa température. Réinoculée le 7 octobre 1897, avec 1 c. c. de sérosité péripneumonique recueillie le 3 sur un poumon envahi par une lésion suraiguë, cette vache n'a présenté ni fièvre ni lésion locale au point d'inoculation.

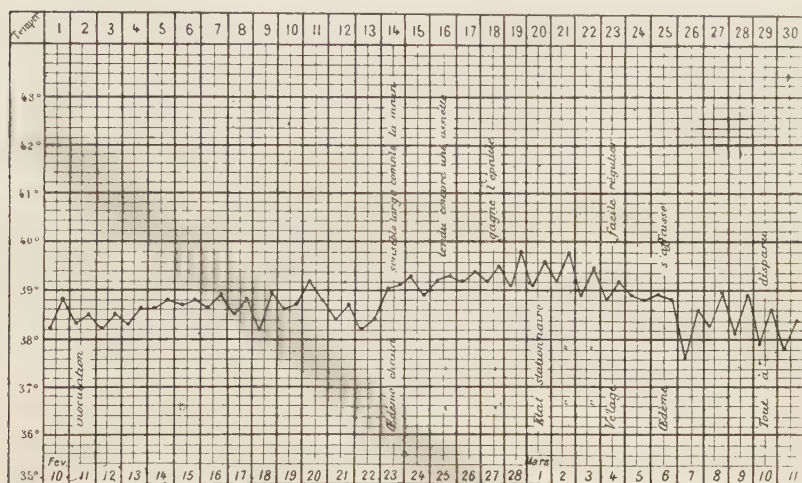


N° 5. — Vache Bretonne, 8 ans, inoculée le 29 avril 1897 avec 10 gouttes de 2^e culture en sac (dilution 1/1,000,000).

Elle était donc bien vaccinée par sa tumeur du mois de mai.

Quatrième série d'expériences.

Le 19 janvier 1898, un poumon atteint de péripneumonie aiguë, envoyé de la Villette, permet de recueillir purement, dans les sacs lymphatiques sous-pleuraux, plusieurs pipettes de sérosité limpide. Après s'être assuré, par ensemencement sur gélose et sur bouillon, que cette sérosité ne renferme aucune bactérie banale, on prépare des sacs de collodion et de



N° 6. — Vache bretonne, 4 ans, pleine de 8 mois, inoculée le 11 février 1898 avec 5 gouttes culture en sac de roseau.

moelle de roseau que l'on emplit d'une dilution au 1/200. Le 29 janvier, ces sacs sont insérés dans le péritoine de deux lapins et de deux cobayes. Chaque sujet reçoit un sac de collodion et un sac de roseau.

Les quatre animaux sont sacrifiés le 10 février.

Les sacs des cobayes n'ont donné aucune culture; ils renferment un liquide limpide et transparent.

Au contraire, les sacs des lapins ont tous cultivé; le liquide qu'ils renferment est louche, opalin, plein des petits grains mobiles et réfringents accoutumés. La culture, peu abondante dans les sacs de collodion, est d'une grande richesse dans les sacs de sureau; le liquide est lactescent.

Le 11 février, à 9 heures du matin, on inocule sous la peau, en arrière de l'épaule gauche, à une vache bretonne (vache n°6), âgée de 4 ans, pleine de huit mois, cinq gouttes de la culture en sac de roseau, diluées dans 2 c. c. cubes de bouillon stérilisé.

Jusqu'au 22, rien d'anormal; ce jour-là, on constate au point d'inoculation un peu de sensibilité à la pression, rien de plus; la température est à 38°,5. Le 23, œdème un peu chaud et sensible, large comme la paume de la main. La température s'élève au-dessus de 39°. Le 25, il existe une tuméfaction dure, tendue, chaude, très douloureuse, ayant les dimensions d'une assiette; les jours suivants, la tuméfaction s'étend sous l'épaule dont elle gêne les mouvements; l'animal se défend de la corne et du pied quand on y porte la main; la tumeur reste stationnaire jusqu'au 2 mars, puis elle s'affaisse peu à peu, lentement et graduellement, pour disparaître entièrement le 10 mars. La température, qui s'était élevée jusqu'à 39°,8, retombe à la normale à compter du 3 mars. Le 4 mars a lieu la mise bas; elle se fait rapidement, sous nos yeux, sans efforts; la délivrance est presque immédiate. Depuis cette époque, la vache n'a pas éprouvé le plus petit malaise.

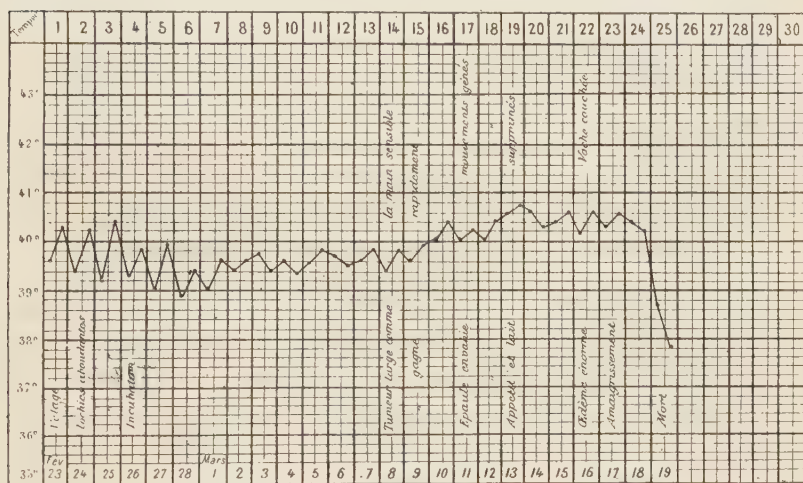
Le 10 février, on avaitensemencé plusieurs tubes de bouillon-peptone, sérum, avec une trace de la culture en sac de roseau; seul, le bouillon Martin, additionné d'un peu de sérum de bœuf ou de lapin, cultiva, le liquide prenant peu à peu l'aspect opalescent du liquide des sacs; on continua les cultures successives et, le 26 février, on put inoculer à une vache bretonne (n° 7), 3 ans, fraîche vèlée, dix gouttes d'une cinquième culture *in vitro*. L'inoculation fut faite en arrière de l'épaule droite.

En voici l'observation résumée :

Le vêlage et la délivrance ont eu lieu le 23 février; les suites ont été assez régulières; cependant, pendant plusieurs jours, la vache a rendu d'assez grandes quantités de matières sanguinolentes grisâtres, légèrement purulentes; puis tout est rentré dans l'ordre. Le veau, séparé de la mère, a été nourri au seau; la vache donnait de quatre à cinq litres de lait à chaque traite.

Rien à noter au point d'inoculation jusqu'au 8 mars; ce jour-là apparaît une tuméfaction de la largeur de la main, dure et sensible; la tumeur gagne rapidement les jours suivants,

augmentant de tension et de sensibilité; elle s'insinue sous l'épaule qu'elle écarte du tronc et dont elle gêne les mouvements. Dès le 11, la température s'élève au-dessus de 40°, et elle reste à ce niveau jusqu'à la mort, atteignant, le 13 mars, 40° 7. En même temps que l'engorgement progresse dans tous les sens, — gagnant le fanon où il forme une tumeur œdémateuse, molle et tremblotante, du volume de la tête d'un enfant, s'étendant le long de la ligne blanche jusqu'aux mamelles, formant sous le



N° 7. — Vache bretonne, 3 ans, vèlée le 23 février, inoculée le 25 février 1898 avec 10 gouttes d'une 5^e culture *in vitro*.

ventre une tumeur œdémateuse de l'épaisseur du bras, — la sécrétion lactée diminue considérablement, l'appétit est supprimé, la bête maigrit à vue d'œil; la rumination persiste, lente et irrégulière.

Le 17 mars, l'engorgement est énorme, l'appui ne se fait plus sur le membre antérieur gauche, le bras et l'avant-bras sont fortement œdématisés, tout mouvement est impossible.

Le 18 mars, l'animal est étendu sur la litière, absolument incapable de se relever. Il succombe le 19 mars, vers 2 heures, avec de l'hypothermie (37° 8).

Autopsie. — En dépouillant l'animal, on fait écouler une quantité énorme de sérosité citrine et transparente.

Le tissu conjonctif sous-cutané est le siège d'une infiltration

considérable qui atteint, en certains points, plus de 10 centimètres d'épaisseur ; l'exsudation occupe toute la face inférieure du corps, depuis l'encolure jusqu'aux mamelles ; elle remonte le long de la trachée dans la gouttière de la jugulaire, elle descend dans l'avant-bras, en dehors comme en dedans de l'aponévrose, disséquant les muscles jusqu'au-dessous du genou.

Il existe un peu de sérosité dans les cavités pleurales et péricardique ; mais le poumon et tous les viscères sont absolument sains.

Ci-joint la courbe de la température de la vache n° 7 depuis le vêlage jusqu'à la mort.

Le 19 mars, on inocule à une vache bretonne, âgée de 3 ans (n° 8), 1 c. c. d'une dixième culture (*in vitro*) du microbe de la péripneumonie en bouillon Martin-sérum.

Le 28 mars, la température s'élève de 2°, une tumeur œdémateuse apparaît au point d'inoculation et s'étend les jours suivants, le membre antérieur est écarté, la région chaude est douloureuse. On constate une respiration accélérée et une matité dans la partie supérieure du poumon droit. Le 6 avril, matité au niveau de la 7^e côte gauche région moyenne, et matité à la partie inférieure du poumon droit. Dans ces points, le murmure respiratoire est presque imperceptible. L'état général est grave. A partir du 8 avril, l'œdème, qui avait envahi la face externe du bras et l'aisselle, commence à diminuer. Le 15 avril, l'état général est redevenu bon, et la matité a disparu en partie. On constate seulement de la crépitation à la partie inférieure des deux poumons. La température se maintient au-dessus de 39°, mais la maladie marche vers la guérison.

RECHERCHES SUR L'INFLUENCE DE L'ORGANISME SUR LES TOXINES

TROISIÈME MÉMOIRE

TOXINE TÉTANIQUE ET LEUCOCYTES

PAR M. ÉLIE METCHNIKOFF

(Rapport communiqué au Congrès international d'hygiène à Madrid.)

Depuis la fondation de la section de microbiologie aux congrès internationaux d'hygiène, la question de l'immunité est restée à l'ordre du jour. D'abord, c'était le problème de l'immunité vis-à-vis des microbes qui occupait l'attention. Au Congrès de Londres, toute une séance y a été consacrée et vous vous rappelez bien la profonde divergence de vues des partisans des théories humorales et de la théorie cellulaire de l'immunité. M. Buchner, dont nous regrettons aujourd'hui si vivement l'absence, a exposé alors, avec sa clarté habituelle, son opinion sur l'immunité dans les maladies infectieuses. Cette immunité consistait, pour lui, en une action bactéricide des humeurs, grâce à la présence des alexines qui se trouveraient constamment dans le sang, en quantité suffisante pour détruire les microbes ¹.

Au Congrès de Budapest, M. Buchner ² modifia sa théorie en ce sens qu'il attribua aux leucocytes le rôle de producteurs des alexines qui ne se trouveraient pas accumulées une fois pour toutes dans les humeurs, mais seraient sécrétées par les leucocytes au fur et à mesure de leurs besoins, pour défendre l'organisme contre les microbes.

Dans la dernière publication de M. Buchner ³, les leucocytes sécrèteraient non plus des substances capables de détruire les microbes dans les humeurs, mais seulement des substances qui influenceraient, et ceci encore d'une façon passagère, le fonc-

1. *Munchener, med. Woch.*, 1891, n°s 32 et 33.

2. *Munchener*, 1894, n°s 37 et 38.

3. *Munchener*, 1897, n° 47.

tionnement chimique des microbes. Après cet affaiblissement momentané, les agents pathogènes seraient englobés par les phagocytes et subiraient dans leur intérieur l'action destructive des substances microbicides.

M. Buchner s'aperçoit lui-même que sa théorie modifiée se rapproche de celle des phagocytes. L'école de M. Bouchard, qui pendant si longtemps a fait opposition à cette dernière théorie, se montre dans ces derniers temps beaucoup plus conciliante. Par l'organe de M. Roger¹, cette école a déclaré au Congrès de Moscou que : « sans l'intervention de la phagocytose, les microbes auraient fini par se développer comme ils le font dans les sérums au dehors de l'organisme; et la maladie, pour avoir été retardée dans ses débuts ou pour être atténuée dans ses manifestations, aurait fini par éclater ».

Les derniers travaux, provenant du laboratoire de M. Denys, à Louvain, accusent la même tendance, d'une façon encore plus marquée. Il a paru tout récemment un mémoire de M. Marchand² sur l'immunité vis-à-vis du streptocoque, dont l'auteur se place entièrement sur le terrain de la théorie des phagocytes.

L'Institut pour les maladies infectieuses à Berlin conserve son attitude plus que réservée vis-à-vis de cette théorie, sans cependant l'attaquer d'une façon aussi générale qu'autrefois. Le principal argument sur lequel se base cette école consiste dans la destruction extracellulaire des microbes dans le péritoine des animaux vaccinés, fait bien démontré par M. R. Pfeiffer. Voilà pourquoi, dans les travaux nombreux exécutés à l'Institut de Berlin, on étudie presque exclusivement les phénomènes de l'immunité dans la cavité péritonéale, et cependant il faut bien accepter que cette destruction en dehors des cellules ne s'opère que dans le péritoine et seulement dans certaines conditions bien déterminées. Dans le péritoine préparé par des inoculations préventives, ainsi que dans les autres régions de l'organisme (sous la peau, dans l'œil, etc.), la destruction des microbes s'opère dans l'intérieur des phagocytes, en parfaite harmonie avec la théorie cellulaire.

M. Behring³, dans son exposé général de l'immunité, a

1. *Etude sur l'immunité*, Paris, 1897, p. 29.

2. *Archives de médecine expériment.*, 1898, p. 253.

3. Art. Immunität dans la *Real-Encyclopädie d'Eulenburg*, 3^e édit., 1897, vol. XI.

accordé une place marquée à la phagocytose dans l'immunité contre les microbes. Seulement il insiste beaucoup sur ce fait que, dans l'immunité vis-à-vis des toxines, ce sont d'autres facteurs qui agissent, et que souvent la phagocytose ne peut s'opérer qu'à la suite d'une action préalable des antitoxines¹.

Sans entrer dans les détails, nous pouvons donc conclure que la réaction des phagocytes contre les microbes, comme défense de l'organisme, est un fait généralement accepté. Ce résultat se faisait déjà bien sentir au Congrès de Budapest en 1894, où l'opposition a été bien moins vive qu'aux Congrès précédents de Londres et de Vienne.

Cependant la science ne pouvait pas se contenter d'établir ce résultat, il lui fallait autant que possible approfondir l'étude de l'immunité.

Parmi les facteurs dont le rôle, à côté de celui des phagocytes, a dû surtout attirer l'attention des savants, il faut signaler avant tout le pouvoir antitoxique de l'organisme, que nous a fait connaître la grande découverte de M. Behring. Comme les microbes sont nuisibles surtout par leurs poisons, les agents qui détruisent ces toxines ont donc une importance capitale.

Depuis mes recherches sur l'immunité des lapins contre le microbe de la pneumo-entérite des porcs, j'ai attiré l'attention sur l'analogie entre la réaction phagocytaire contre le microbe vivant et contre la toxine².

Deux années plus tard, au Congrès de Budapest, je me suis cru autorisé à formuler cette opinion³ que les phagocytes réagissent contre les toxines microbiennes et même contre les poisons minéraux, comme l'arsenic.

Depuis cette époque, plusieurs membres de l'Institut Pasteur, notamment M. Roux, ainsi que moi-même avec quelques-uns de mes élèves, parmi lesquels je citerai MM. Chatenay, Marie et Besredka, nous nous sommes occupés beaucoup de cette question du sort des toxines dans l'organisme, et du rôle des leucocytes dans la défense contre les poisons.

Le fait que les microbes élaborent des poisons dans leur corps, rapproché de cet autre fait que les phagocytes englobent

1. *Deutsche med. Woch.*, 1898, N° 5.

2. *Annales de l'Inst. Past.*, 1892, p. 308.

3. *Ann. de l'Inst. Past.*, 1894, pp. 719, 721.

si souvent les microbes entiers, amenait la conclusion que ces cellules sont capables d'absorber les toxines. Dans l'étude sur la toxine et l'antitoxine cholériques, faite par MM. Roux, Salimbeni et moi-même, il a été précisé que les phagocytes absorbent et digèrent la toxine cholérique¹.

On conçoit facilement la grande difficulté de ce genre d'études, en présence de l'impossibilité de constater d'une façon directe l'existence d'une toxine bactérienne dans les tissus et les cellules. Et cependant nous avons réussi à démontrer le fait de l'absorption de la toxine tétanique par les leucocytes de la poule². En provoquant des exsudats chez des poules, auxquelles on injectait préalablement cette toxine, j'ai pu me convaincre que ces exsudats, beaucoup plus riches en leucocytes que le sang, étaient aussi plus tétanigènes que celui-ci.

D'un autre côté, j'ai observé une leucocytose plus ou moins marquée à la suite de l'injection de doses non mortelles de toxine tétanique à des poules.

Cette réaction leucocytaire, à la suite de l'introduction de la toxine tétanique dans l'organisme, se produit non seulement chez les espèces très résistantes, comme la poule, mais aussi chez le cobaye, mammifère des plus sensibles à la toxine tétanique. Même à la suite de l'injection de doses plusieurs fois mortelles, il se manifeste une leucocytose des plus accusées, et ce n'est qu'après l'introduction d'une quantité cent fois mortelle que le nombre des leucocytes reste stationnaire ou présente une diminution. Tous ces faits indiquent donc que l'organisme le plus sensible présente une réaction manifeste contre la toxine tétanique.

Comme les leucocytes de la poule, qui deviennent si nombreux après l'injection de la toxine tétanique, absorbent ce poison, il se pourrait bien que les leucocytes du cobaye le prennent aussi pendant l'hyperleucocytose. La preuve cependant n'est pas facile à fournir, précisément à cause de la grande sensibilité des cobayes et de l'impossibilité de leur injecter d'assez fortes quantités de toxines pour permettre l'essai des exsudats sur des animaux. Pour arriver à un résultat précis, il faut par conséquent recourir à une argumentation indirecte.

1. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1896, p. 272.

2. *Ibid.*, 1897, p. 808.

Tout le monde a présentes à la mémoire les expériences intéressantes de MM. Wassermann et Takaki¹, dans lesquelles ils ont constaté l'inactivité de la toxine tétanique lorsqu'elle est injectée avec de la substance cérébrale. M. Wassermann, guidé par la théorie si suggestive de M. Ehrlich, ce savant qui a tant contribué à nos connaissances sur l'immunité contre les toxines, a supposé l'existence, dans les centres nerveux des animaux normaux, d'une antitoxine comparable à l'antitoxine artificielle que MM. Behring et Kitasato ont découvert dans le sang des animaux vaccinés contre le tétanos.

M. Wassermann et, avec lui, un grand nombre de savants qui ont abordé le même sujet admettent que l'antitoxine du cerveau normal, injectée à des souris, se résorbe dans leur organisme et, se rencontrant dans le sang avec la toxine tétanique, la neutralise d'une façon définitive, tout à fait comme le ferait un sérum antitétanique.

Constatons d'abord que cette action est très limitée dans l'espace et dans le temps. Pour bien empêcher l'intoxication, il faut mélanger le cerveau avec la toxine tétanique. Si l'on injecte les deux matières séparément, l'effet sera insignifiant ou nul.

M. Marie² a prouvé que si on injecte de la matière cérébrale dans une patte postérieure d'un lapin et de la toxine dans l'autre patte, celui-ci prend le tétanos et en meurt comme le témoin. Bien plus, si l'on injecte sous la peau de la face dorsale de la cuisse d'un cobaye de la substance cérébrale en quantité suffisante pour neutraliser une dose plusieurs fois mortelle de toxine tétanique, et sous la peau de la face ventrale de la même cuisse la dose mortelle de cette toxine, le cobaye prendra le tétanos mortel. L'action antitoxique de la substance nerveuse ne se répand donc même pas à faible distance : elle est strictement locale.

Ce résultat se confirme par un autre mode d'expérimentation. On injecte de l'émulsion cérébrale dans la cavité péritonéale d'un cobaye. Le lendemain, on lui inocule dans une patte postérieure la toxine tétanique. Le cobaye meurt du tétanos comme son témoin.

L'action de la substance cérébrale est également limitée au

1. *Berliner klinische Wochenschr.*, 1898, n° 1, p. 4, 5.

2. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1898, p. 93.

point de vue du temps. Lorsque l'on injecte la toxine tétanique 24 heures après la substance cérébrale, au même endroit, par exemple dans le péritoine d'un cobaye, on le préserve sûrement du tétanos. Mais si l'on attend plus longtemps, et si l'on inocule la toxine 48 heures ou plus longtemps après l'émulsion cérébrale, le cobaye prend inévitablement le tétanos mortel.

Cette série de faits prouve une localisation étroite dans l'action de la matière cérébrale et, en même temps, démontre la grande différence entre ce phénomène et l'action du sérum anti-tétanique.

Il est bien prouvé, par le travail de MM. Roux et Borrel inséré dans ce numéro, et par les recherches de MM. Knorr¹ et Blumenthal², que la toxine tétanique, mise en présence du cerveau broyé, est fixée par celui-ci. Ce fait explique l'importance du contact intime entre les deux substances pour la prévention de l'animal contre le tétanos.

La toxine tétanique, injectée en mélange avec le cerveau broyé, se trouve à l'état fixé dans l'organisme. Mais cette fixation n'est pas permanente et ne suffit pas par elle seule pour empêcher le tétanos.

Comme je l'ai indiqué dans un mémoire antérieur³, la toxine ne se détruit pas dans ces conditions, mais peut facilement manifester son action tétanigène. La matière cérébrale de lapin et de cobaye agit d'une façon beaucoup plus efficace chez la souris que chez le cobaye. La dose du mélange de cerveau et de toxine tétanique deux fois mortelle pour le cobaye et 20 fois mortelle pour la souris est cependant beaucoup plus tétanigène pour le premier. Chez le cobaye, ce mélange, injecté dans les muscles de la cuisse, produit un tétanos grave, quoique le plus souvent non mortel, tandis que chez la souris, il ne provoque qu'un tétanos léger ou nul. De ces faits, j'ai déduit que la matière cérébrale ne détruit pas la toxine tétanique, dont l'effet est empêché par l'intervention de l'organisme.

Seulement, dans l'expérience que je viens de citer, il s'agit de deux espèces animales différentes. On pourrait donc objecter que le cerveau agit sur la toxine dans les humeurs du

1. *Münch. med. Wochenschr.*, 1898.

2. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1898, n° 12, p. 187.

3. *Ann. de l'Inst. Past.*, 1898, p. 89.

cobaye d'une façon autre que dans celles de la souris. Eh bien, l'intervention de l'organisme peut être démontrée chez la même espèce. Pour cela, il suffit d'injecter le même mélange de cerveau et de toxine, tantôt dans les muscles de la cuisse, tantôt dans le péritoine des cobayes. Bien que, en général, l'injection de la toxine tétanique soit plus meurtrière dans le péritoine que dans les muscles de la cuisse, l'effet du mélange sera plus prononcé dans la cuisse que dans le péritoine. Comme je l'ai dit tout à l'heure, la toxine tétanique injectée avec la matière cérébrale dans la cuisse provoque un tétanos grave ; l'injection du même mélange dans la cavité péritonéale n'est suivie d'aucun effet morbide, ou, s'il y a raideur des muscles abdominaux, celle-ci est très faible et passagère.

L'action de la matière cérébrale sur la toxine tétanique est donc très localisée et nécessite, pour que le tétanos soit empêché, l'intervention de l'organisme. Pour nous faire une idée plus précise du mécanisme de cette intervention locale, injectons le mélange de cerveau et de toxine dans le péritoine des cobayes, et prélevons, à l'aide de tubes effilés, le liquide péritonéal au bout de quelques minutes, de quelques heures ou de quelques jours. Dans tous ces cas, nous trouverons la lymphe du péritoine remplie d'une quantité très grande, souvent énorme de leucocytes, parmi lesquels nous serons surpris de ne trouver que des gros mononucléaires.

Quelques minutes déjà après l'injection du mélange, ces macrophages se trouvent bourrés de matière cérébrale ; souvent on ne distingue que le noyau du leucocyte, entouré de masses de myéline et de fragments de cellules nerveuses. Quelques heures après l'injection, quelquefois même au bout de 20 minutes seulement, on ne trouvera plus de matière cérébrale libre : elle sera toute englobée par les macrophages. Ces cellules bourrées de particules de cerveau restent pendant longtemps logées dans la cavité péritonéale, et encore 3 semaines après l'injection du mélange on en trouve des quantités dans la lymphe du péritoine.

La digestion intracellulaire de la matière cérébrale par les macrophages se fait évidemment avec une grande lenteur.

Comme il est démontré que la toxine tétanique est fixée à la matière cérébrale et comme celle-ci est en peu de temps englobée :

par les macrophages, il en résulte que la toxine elle aussi a dû être incorporée par les phagocytes.

Si l'on compare cette réaction des mononucléaires dans la cavité péritonéale et dans les muscles de la cuisse, on constate facilement que, dans ce dernier lieu, elle est beaucoup plus lente à se produire que dans le péritoine. En outre, l'exsudat de la cuisse est plus riche en leucocytes polynucléaires, qui n'absorbent que très peu de matière cérébrale, qu'en macrophages si avides de cette substance. On comprend donc facilement pourquoi la toxine tétanique, injectée en mélange avec l'émulsion cérébrale, est plus tétanigène dans la cuisse que dans le péritoine. Dans la cuisse, elle reste plus longtemps en dehors des phagocytes, et peut s'échapper plus facilement pour provoquer l'intoxication tétanique. Dans le péritoine, elle est rapidement incorporée par les macrophages, et ces cellules doivent évidemment empêcher son action tétanigène. Nous arrivons donc à cette conclusion *que la toxine tétanique, fixée sur la matière cérébrale, est absorbée par les macrophages et empêchée dans son action tétanigène. Ces cellules sont donc un moyen de défense de l'organisme contre les toxines. Leur action peut être caractérisée comme une action détruisante ou phlérotoxique.*

Les données que je viens de résumer s'accordent bien avec un grand nombre de faits acquis dans la science. Après avoir fait sa découverte, M. Wassermann a admis que le cerveau normal fixe la toxine tétanique et neutralise son action. Cette interprétation ne peut pas être acceptée comme je l'ai déjà développé dans mon mémoire précédent sur le sort des toxines dans l'organisme; M. Roux, avec ses collaborateurs MM. Morax et Borrel, a démontré que la toxine tétanique, injectée directement dans le cerveau des lapins, même en quantité beaucoup plus faible que celle qui est nécessaire pour produire le tétanos par injection intramusculaire, provoque un tétanos cérébral mortel. Et cependant un simple fragment de cerveau de lapin, broyé et mélangé avec la toxine tétanique, exerce une action préventive très nette. Cette différence s'explique par ceci que dans l'injection directe de la toxine dans le cerveau, celui-ci fixe bien la toxine, mais il ne se produit pas de réaction leucocytaire suffisante, tandis que l'injection du mélange de toxine et de matière cérébrale sous la peau, dans le muscle ou le péritoine, amène une

réaction leucocytaire considérable et efficace. La découverte si intéressante de M. Wassermann, au lieu de prouver l'existence d'une antitoxine cérébrale, a abouti à la démonstration de l'action des phagocytes contre les toxines.

Cette action, que nous avons tâché de déterminer dans un exemple précis, est très probablement la manifestation d'une loi générale. Nous avons déjà mentionné le fait de l'englobement des microbes renfermant dans leur corps des toxines par des phagocytes. Dans cette catégorie doit être rangée l'observation de MM. Vaillard et Vincent ¹, de l'innocuité des bacilles tétaniques qui renferment la toxine tétanique dans leur corps, mais qui ne produisent pas d'empoisonnement, grâce à l'englobement efficace par les leucocytes.

L'hyper-leucocytose que l'on observe régulièrement après l'injection de toxines en doses non mortelles ou en quantités pas trop rapidement mortelles, s'explique aussi par le rôle phlébotoxique des leucocytes, analogue à l'action antimicrobienne de ces cellules. Il a été constaté depuis longtemps que l'injection des sels de fer, aussi solubles que possible, amène une réaction des phagocytes très prononcée. Grâce à la facilité avec laquelle on révèle la présence du fer dans les cellules, à l'aide des réactions microchimiques, il a été démontré, notamment par les élèves de M. Kobert à Dorpat ², que cette substance est absorbée par les leucocytes et les autres phagocytes, et est transportée surtout dans le contenu du tube digestif.

Mais le fer n'étant pas un véritable poison, l'histoire de son élimination de l'organisme ne peut servir que comme indication pour des recherches sur des éléments plus toxiques. Parmi ceux-ci, il faut mentionner notamment l'arsenic, poison dont l'intérêt s'accroît à cause de la facilité avec laquelle on habitue les animaux de laboratoire à absorber la dose mortelle. De mes expériences sur la réaction de l'organisme contre l'arsenic chez les lapins accoutumés et chez les témoins, expériences communiquées au Congrès de Budapest, mais surtout des recherches beaucoup plus nombreuses et suivies, exécutées par M. Besredka et encore inédites, il résulte une intervention active des leucocytes. Tandis que des doses rapidement mortelles produisent

1. Ces *Annales*, 1891, p. 26.

2. *Arbeiten a. d. pharmakol. Inst. in Dorpat* (1893, 1894).

chez les animaux neufs une hypoleucocytose véritable et progressive, chez les animaux accoutumés elles provoquent une forte hyperleucocytose, dans laquelle les polynucléaires jouent le rôle prédominant. Il devient de plus en plus probable que les phagocytes, ces éléments qui ont le mieux conservé le type ancestral, amœbien, sont les cellules les moins sensibles à l'action toxique des poisons. Grâce à cette particularité, ils peuvent impunément pour eux, se charger de grandes quantités de substances toxiques qui alors n'atteignent plus les éléments beaucoup plus sensibles aux poisons, comme, par exemple, les cellules nerveuses.

Il est extrêmement probable que les toxines subissent une modification chimique, une sorte de digestion dans l'intérieur des phagocytes. Malheureusement cette question est trop délicate pour être résolue en peu de temps et voilà pourquoi, pour le moment, il faut se contenter d'hypothèses, qui peuvent du reste servir à faciliter la solution expérimentale du problème posé.

M. Portier ¹ a démontré récemment que les leucocytes vivants renferment des ferments oxydants qui s'échappent facilement après la mort de ces cellules. Il est donc très probable que les toxines bactériennes absorbées par les phagocytes y subissent l'influence de ces oxydases. Or, il est depuis longtemps connu que l'oxygène affaiblit en peu de temps et même détruit les toxines bactériennes. Guidés par ce fait, MM. Roux et Metchnikoff ont conçu depuis plus d'un an un plan de recherches sur l'influences des oxydases sur les toxines, qu'ils sont en train d'exécuter.

L'ensemble des données que je viens de résumer permet donc de conclure que les phagocytes jouent un rôle très important non seulement vis-à-vis des microbes, mais aussi dans la défense de l'organisme contre les poisons. D'un autre côté, les faits réunis dans ce rapport peuvent servir d'argument en faveur de cette thèse que les phagocytes peuvent accomplir leur fonction antimicrobienne sans que les produits toxiques des microbes pathogènes aient subi une destruction préalable et indépendante des cellules phagocytaires.

1. *Les Oxydases*, Paris, 1897.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LE MODE DE DESTRUCTION

DES VIBRIONS DANS L'ORGANISME

PAR M. LE D^r J. CANTACUZÈNE

(Travail du Laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Le rôle tout à fait prédominant des phagocytes dans la destruction des vibrions qui ont pénétré dans les tissus semblait un fait définitivement acquis à la science, lorsque M. Pfeiffer, en 1894, publia une expérience qui, selon lui, ruinait complètement la doctrine phagocytaire de l'immunité : si l'on injecte une émulsion de vibrions cholériques dans le péritoine d'un cobaye hyper-vacciné contre le choléra, ou bien cette même émulsion additionnée de sérum préventif dans le péritoine d'un cobaye neuf, on observe que très rapidement, 5, 10, 20 minutes après l'injection, les vibrions perdent leur forme allongée et se transforment en granulations arrondies, immobiles, libres dans l'exsudat ; au bout d'un temps très court, ces granulations disparaissent, dissoutes par le liquide ambiant. Voilà donc un cas bien net de destruction des vibrions dans les humeurs ; ici l'activité des phagocytes n'a joué aucun rôle, et l'animal a guéri sans leur intervention. Il s'agit là, vraisemblablement, d'une sécrétion bactéricide due, surtout, aux cellules endothéliales du péritoine. M. Pfeiffer attache à ce fait une importance doctrinale considérable ; il le considère comme apportant une preuve décisive en faveur de l'action bactéricide des humeurs dans la lutte de l'organisme contre les microbes.

M. Metchnikoff, reprenant l'étude du phénomène de Pfeiffer, constata d'abord que la dissolution des granulations n'est jamais extracellulaire : en effet, elles conservent indéfiniment leur forme dans l'exsudat péritonéal placé, en goutte suspendue, à l'étuve à 37°. La destruction de ces granules se fait à l'intérieur du protoplasma des phagocytes ; peu de temps après l'injection de Pfeiffer, l'exsudat se peuple de leucocytes nouvellement arrivés,

qui englobent rapidement les granulations et les digèrent à l'intérieur de vacuoles intracellulaires. — Mais le rôle des leucocytes ne s'arrête pas là; ce sont eux, en effet, qui, grâce aux substances bactéricides qu'ils renferment, sont les véritables agents de la transformation en granules des vibrions cholériques; au contraire, l'endothélium péritonéal ne joue aucun rôle dans ce phénomène. En effet, on peut réaliser *in vitro* le phénomène de Pfeiffer, à condition qu'à l'émulsion de vibrions additionnée de sérum préventif, on ajoute une trace de lymphé péritonéale normale contenant des leucocytes.

Si, d'autre part, on observe attentivement ce qui se passe après que l'on a injecté dans le péritoine d'un cobaye neuf le mélange de Pfeiffer, on remarque que peu de secondes après l'injection, les leucocytes de la cavité péritonéale deviennent subitement immobiles, s'agglutinent en paquets, et s'entourent d'une substance glaireuse qui diffuse hors de leur protoplasma; au contact de cette substance, les vibrions se transforment en granules. Il s'agit là d'un véritable phénomène de *phagolyse*: sous l'action de l'injection de Pfeiffer, les phagocytes présentent momentanément un état de souffrance, au cours duquel ils laissent diffuser la substance bactéricide contenue dans leur protoplasma. S'il est vrai que la phagolyse soit due à un affaiblissement momentané des phagocytes, il est naturel de supposer que le renforcement de leur activité supprime la phagolyse et, par conséquent, la transformation extracellulaire des vibrions; c'est ce qui a lieu en effet si, 24 heures avant d'injecter le mélange de Pfeiffer, on injecte dans le péritoine des cobayes 3 c. c. de bouillon: dans ce cas, la transformation des vibrions en granules n'a plus lieu dans le liquide de l'exsudat; les vibrions sont presque instantanément englobés par les leucocytes, et c'est à l'intérieur du protoplasma de ces derniers que s'opère la transformation. Il est bien évident, dans ce cas, que c'est grâce à une action phagocytaire très intense que l'animal s'est débarrassé des vibrions.

M. J. Bordet, de son côté, a pu observer que la transformation des vibrions en granulations est due aux substances bactéricides élaborées par les leucocytes, substances non spécifiques, et existant, mais en faible quantité, chez les leucocytes des animaux neufs: chez ces derniers, en effet, il est aisé de constater, à l'in-

térieur du *protoplasma*, la transformation en granules des vibrions englobés.

Chez les animaux hypervaccinés, cette transformation se fait avec une intensité beaucoup plus considérable, grâce à l'apparition, dans l'organisme de ces derniers, d'une substance *spécifique*, la substance préventive, qui représente probablement un produit microbien modifié par l'activité cellulaire. Cette substance spécifique a la propriété d'exalter le pouvoir bactéricide des leucocytes en lui imprimant un caractère de spécificité, et la transformation des vibrions en granules s'opère grâce au mélange des deux substances, bactéricide et préventive, que ce mélange se fasse à l'extérieur ou à l'intérieur des leucocytes.

Les leucocytes sont bien le lieu de formation et le siège de la substance bactéricide; elle y reste contenue durant la vie de l'animal et ne diffuse dans le liquide ambiant que si les leucocytes placés dans des conditions de vie anormales laissent, en éclatant, échapper leur contenu; si en effet l'on fait *in vivo* la séparation du sérum et des cellules (soit en déterminant un œdème par compression, soit en produisant l'hypoleucocytose du sang par des injections intraveineuses de poudres inertes), le sérum ainsi obtenu ne présente pas de propriété bactéricide; quant à son pouvoir préventif, il est faible. Si au contraire la séparation a lieu *in vitro*, le sérum est à la fois très bactéricide et très préventif.

Ces deux substances sont parfaitement distinctes: le sérum d'un vacciné, chauffé à 55°, perd ses propriétés bactéricides, mais conserve ses propriétés préventives, qui ne disparaissent pas lorsque l'on maintient le liquide pendant une heure à une température de 70° (ce dernier fait avait déjà été établi par MM. Fraenkel et Sobernheim).

Alors que le sérum préventif chauffé à 55° est incapable de produire à lui seul le phénomène de Pfeiffer *in vitro*, il suffit d'y ajouter une trace de sérum contenant de la substance bactéricide (p. ex. du sérum frais de cobaye neuf) pour que la transformation en granulations se produise aussitôt.

Le mélange des deux substances est donc la condition nécessaire et suffisante pour la production du phénomène.

Le sérum préventif exerce sur les leucocytes une action chimio-tactique positive; il est un excitant puissant de l'activité

phagocytaire : ainsi, que l'on mélange du sang défibriné bien frais à une émulsion de vibrions, et que l'on ajoute à la goutte pendant une trace de sérum préventif, en portant le tout à 37°, les leucocytes englobent les vibrions et se montrent bientôt bourrés de granulations.

Ces faits nous permettent d'interpréter ainsi le mode d'action du sérum préventif : la substance préventive injectée pénètre dans le protoplasma leucocytaire, s'y mélange à la substance bactéricide, en sorte que les vibrions englobés s'y transforment en granules ; lorsque, par suite d'un état particulier de souffrance, les leucocytes laissent diffuser la substance bactéricide, la transformation en granules sera extra-cellulaire, et nous aurons le phénomène de Pfeiffer.

M. Pfeiffer a cru pouvoir récemment démontrer que la transformation des vibrions en granules est possible dans un tissu très pauvre en leucocytes, comme l'est, p. ex., le tissu cellulaire sous-cutané. Il est bien certain aujourd'hui que si M. Pfeiffer a obtenu la transformation des vibrions dans de pareilles conditions, c'est qu'il a déterminé, au niveau du foyer de l'injection, une petite hémorragie, amenant ainsi des leucocytes au contact de la substance préventive injectée.

M. Salimbeni, étudiant récemment la destruction des vibrions injectés sous la peau d'animaux hypervaccinés, a nettement établi que jamais, dans ce cas, l'on n'observe de transformation extracellulaire des vibrions en boules ; cette transformation s'effectue toujours à l'intérieur des leucocytes polynucléaires (à l'intérieur des mononucléaires, au contraire, les vibrions conservent une forme allongée).

Dans le présent travail nous nous sommes proposé de reprendre l'étude de la transformation extracellulaire des vibrions dans l'organisme, et d'observer les variations du phénomène quand on fait varier l'état d'activité des leucocytes, soit en déprimant cette activité, soit en l'exaltant. Puis nous avons tenté de déterminer quelle part revient à la phagocytose dans la protection de l'organisme, le phénomène de Pfeiffer une fois produit.

Le vibron employé dans nos expériences provenait de l'épidémie qui sévit en 1894 dans la Prusse orientale ; il tuait un cobaye de 400 grammes à la dose de 1/25 de culture

sur gélose, injectée dans le péritoine. Nous nous sommes servi de deux sérums immunisants, obligeamment fournis par notre collègue le Dr Salimbeni; l'un, provenant d'une chèvre, était préventif à la dose de 1/300 de c. c. pour un cobaye de 400 grammes; l'autre, provenant d'une jument, était préventif à la dose de 1/150 de c. c.; 1/10 de goutte du premier, 1/5 de goutte du second donnaient sûrement le phénomène de Pfeiffer dans le péritoine d'un cobaye neuf.

II

Si l'on injecte sous la peau d'un cobaye une émulsion de vibrions cholériques additionnée de sérum préventif, la transformation en granules n'a pas lieu, à condition que l'on ait soin de ne pas déterminer d'hémorragie en piquant la peau. *Le phénomène se produit au contraire chaque fois que le mélange injecté arrive au contact de leucocytes préexistants ou mélangés au liquide d'injection.*

Expérience I. — Un lapin reçoit sous la peau de l'oreille gauche 1 c. c. d'une culture en bouillon de streptocoques, tués par la chaleur à 85°; au bout de trois jours, on injecte dans l'abcès ainsi formé 1/2 c. c. d'une émulsion de vibrions additionnée de 1 goutte de sérum immunisant. Simultanément le même mélange est injecté sous la peau de l'oreille droite et sous la peau de la cuisse; en ce dernier point, on a soin de provoquer au préalable une légère hémorragie. Au bout de 1/2 heure, presque tous les vibrions injectés dans la cavité de l'abcès sont transformés en grosses granulations arrondies, prenant le violet avec énergie; un grand nombre sont englobées par les leucocytes polynucléaires; un nombre plus grand est libre. Au bout de 3 heures on retrouve beaucoup de granulations libres, mais plus aucun vibrion ayant conservé sa forme. Les vibrions injectés sous l'autre oreille sont entiers, sans trace de transformation au bout de 3 heures; au niveau du foyer hémorragique, les 3/4 des vibrions sont transformés en granules au bout de 1/2 heure; la transformation est complète 2 heures plus tard.

Expérience II. — On provoque chez un lapin la formation d'un abcès en lui injectant sous la peau de l'oreille une culture tuée de streptocoques. Quelques gouttes du pus ainsi formé sont

mélangées à 1 c. c. d'une émulsion de vibrions, additionnée de 1 goutte de sérum préventif. Le mélange est injecté sous la peau de l'oreille d'un second lapin : au bout de 10 minutes, il y a transformation partielle; au bout de 25 minutes, transformation complète des vibrions en granulations de Pfeiffer. Le même mélange, mais sans addition de pus, injecté sous la peau de l'autre oreille, ne présentait au bout de 3 heures aucune trace de transformation.

Expérience III. — Un lapin porteur, à la face ventrale, de 3 gros abcès froids provoqués par l'injection sous-cutanée de bacilles tuberculeux tués, reçoit : a) dans la cavité de l'un des abcès, 1 c. c. d'émulsion vibrionienne additionnée de 1 goutte de sérum préventif; la transformation en granules est totale et immédiate; b) le même mélange en injection sous la peau de la cuisse : les vibrions au bout de deux heures ont conservé tous leur forme et leur colorabilité.

Il est hors de doute, d'après cela, que la substance qui transforme en granulations les vibrions cholériques est contenue dans les leucocytes. Les cas où cette transformation ne se fait pas prouvent bien que les cellules fixes du tissu conjonctif ne jouent aucun rôle dans la production du phénomène.

III

Avant de rechercher dans quelle mesure les variations de l'activité leucocytaire retentissent sur la transformation des vibrions en granules, nous allons présenter un tableau rapide, d'après nos propres observations, des péripéties visibles de la lutte qui s'établit entre l'organisme et les vibrions injectés dans le péritoine, d'abord chez des animaux qui possèdent l'immunité active, puis chez des animaux neufs auxquels on injecte du sérum préventif en même temps que des vibrions. On trouve parfois des cobayes qui résistent naturellement à des quantités considérables de vibrions injectés dans le péritoine; pour tous, il existe une dose maxima dont l'organisme triomphe après une courte maladie. Tous les cobayes possèdent donc *jusqu'à un certain point* l'immunité naturelle pour les vibrions cholériques. Voici ce que l'on peut observer en pareil cas : durant la première heure qui suit l'injection, les vibrions vivent à l'aise dans la

cavité péritonéale, y conservent leur forme, leur mobilité et leur colorabilité. On n'observe guère dans ce cas de granulations libres plus nombreuses que celles que l'on peut constamment rencontrer dans les cultures de 36 heures. Les rares leucocytes de l'exsudat ont une apparence saine, mais n'englobent aucun microbe. Au bout de 1 h. 1/2, des leucocytes nombreux commencent à apparaître dans la cavité et englobent immédiatement de grandes quantités de microbes; parmi les vibrions englobés, les uns conservent leur forme allongée, les autres se transforment en grosses granulations, de plus en plus nombreuses : les uns et les autres prennent les couleurs basiques d'aniline. Bientôt les formes allongées aussi bien que les grosses granulations se fragmentent en granulations beaucoup plus petites, colorables au bout de quelque temps par l'éosine; il arrive parfois que les vibrions entiers ou les grosses granulations perdent leur affinité pour les couleurs basiques, et deviennent éosinophiles en bloc, avant leur fragmentation en granulations plus petites. Pourtant ce fait, observé par plusieurs micrographes, est relativement rare. Il résulte de là que le produit de la transformation intracellulaire des vibrions est de deux sortes : grosses granulations, basophiles comme les vibrions eux-mêmes; fines granulations, basophiles d'abord, puis éosinophiles, provenant de la désintégration soit des vibrions (directement), soit des grosses granulations (ces dernières beaucoup plus nombreuses que les vibrions allongés). Le nombre des leucocytes (polynucléaires et mononucléaires du groupe vasculaire) augmente rapidement dans l'exsudat : la phagocytose devient de plus en plus énergique. Au bout d'un nombre d'heures variant de 12 à 20, la presque totalité des vibrions est englobée; assez longtemps cependant quelques vibrions isolés persistent dans l'exsudat sans être englobés, malgré la masse colossale de leucocytes immigrés : ce sont là, sans doute, les individus particulièrement virulents.

Bientôt ces derniers survivants sont englobés à leur tour et l'exsudat est stérile au bout de 48 heures.

Pendant tout le temps que dure ce processus, les vibrions extracellulaires gardent leur forme, leur mobilité, leur colorabilité. A aucun moment on ne trouve en dehors des leucocytes des granules, grands ou petits, ou des microbes éosinophiles. Les

gouttes pendantes faites avec l'exsudat montrent un actif développement intra-leucocytaire des vibrions.

Par conséquent, dans un semblable cas, aboutissant à la guérison, les vibrions sont englobés vivants; il n'y a pas d'action bactéricide de la part des humeurs; la destruction des microbes est entièrement intra-cellulaire; leur transformation en granules l'est également.

Chez les cobayes immunisés contre l'infection vibrionienne, la série des phénomènes est la même; ils se distinguent seulement par leur plus grande énergie. Ainsi, au bout de 10 heures, l'exsudat est purulent et ne renferme plus de microbes libres. Au bout de 25 heures, il est stérile. A aucun moment on ne rencontre de granulations libres en dehors des cellules; les vibrions non englobés gardent leur mobilité et leur forme. Vers la fin du processus, tous les polynucléaires de l'exsudat sont bourrés de très petits grains éosinophiles, appartenant à la catégorie des fines granulations signalées plus haut.

Dans les deux cas (immunité naturelle, immunité acquise), la fin du processus est marquée par l'arrivée de gros mononucléaires à noyau vésiculeux (du groupe lymphoïde), qui englobent bon nombre de polynucléaires et les détruisent à l'intérieur de vacuoles intra-cellulaires.

Par conséquent, dans aucun cas d'immunité active, qu'elle soit naturelle ou acquise, on ne peut observer de transformation extracellulaire de vibrions en granules. Les microorganismes sont constamment englobés vivants, sous leur forme vibrionienne et mobile, par les leucocytes polynucléaires ou mononucléaires (du groupe vasculaire) qui sont, dans ce cas, les seuls agents de la défense de l'organisme contre les envahisseurs.

On sait que si l'on injecte des vibrions cholériques dans le péritoine d'un cobaye *hypervacciné*, ou un mélange de vibrions et de sérum préventif dans le péritoine d'un animal neuf, les vibrions subissent la transformation extra-cellulaire en granules. Il existe donc un certain état d'immunité active, l'état *hypervaccinal*, qui établit un passage naturel entre les cas moyens d'immunité active, où la transformation des vibrions en granules s'effectue à l'intérieur des leucocytes, et les cas d'immunité passive, où cette transformation a lieu hors des cellules; on peut donc *a priori* supposer que le second cas n'est qu'une modification du premier.

En effet, voici la série des phénomènes que l'on observe lorsque l'on injecte, par exemple, dans le péritoine d'un cobaye neuf, une dose mortelle de vibrions, émulsionnés dans du bouillon auquel on a ajouté une goutte de sérum préventif : 10 minutes après l'injection, la moitié des vibrions, 10 minutes plus tard l'immense majorité d'entre eux sont transformés en grosses granulations rondes ou légèrement ovales, non réfringentes, se colorant avec intensité par les couleurs basiques d'aniline. Nous recommandons pour cette étude la coloration par la thionine phéniquée. Le nombre des leucocytes de l'exsudat est à ce moment extrêmement faible ; les lymphocytes ont l'aspect normal ; les polynucléaires, au contraire, ont en général un contour peu net, comme estompé, et se perdant insensiblement dans une zone trouble qui entoure l'élément et se colore légèrement en violet très pâle : cet aspect se différencie nettement de celui des rares leucocytes restés normaux, et dont le bord est nettement délimité. Le noyau des éléments en état de phagolyse conserve ses caractères, ce qui permet de ne pas confondre les leucocytes phagolysés avec une forme de dégénérescence leucocytaire qu'il arrive souvent de rencontrer dans les exsudats abondants : dans ce dernier cas les contours du protoplasma restent nettement marqués, mais le noyau s'est dissocié, et forme une série de gouttelettes arrondies, isolées, dispersées dans le protoplasma, et prenant très fortement les couleurs basiques. Il s'agit là de phénomènes de karyolyse qui accompagnent la mort du leucocyte. L'existence de la zone glaireuse répond, chez les leucocytes phagolysés, à un état de souffrance : en effet, on observe, au contact immédiat de ces éléments, des amas de granulations libres qu'ils refusent d'englober ; tous les vibrions compris dans la zone glaireuse ou situés dans son voisinage sont transformés en granules.

Pendant un temps assez long (1-2 heures), on observe un certain nombre de vibrions qui n'ont pas subi la transformation en granules. Parmi les microorganismes libres dans l'exsudat (vibrions et granulations), quelques-uns prennent mal la couleur, sont réfringents d'aspect, et présentent une coloration de gelée de groseilles claire des plus caractéristiques. Nous reviendrons plus loin sur cet aspect. Une demi-heure après l'injection, le nombre des leucocytes polynucléaires croît rapidement dans l'exsudat ; ces nouveaux arrivants ont leur protoplasma absolu-

ment normal et ne présentent aucune apparence de phagolyse; à partir de ce moment l'englobement des granulations se fait avec la plus grande rapidité; les phagocytes en sont bientôt gorgés; à leur intérieur, ces granulations pâlisent et deviennent invisibles en très peu de temps. Trois heures après l'injection, le nombre des phagocytes est énorme et celui des granulations libres est faible. Il arrive fréquemment que les granulations disparaissent de l'exsudat peu de temps après l'injection, alors que le nombre des phagocytes immigrés est encore peu considérable; il ne faut pas croire pour cela qu'elles se dissolvent dans le liquide ambiant; car si à ce moment on sacrifie l'animal et que l'on examine la surface du péritoine, on la trouve, ainsi que l'avaient déjà constaté MM. Gruber et Durham, entièrement recouverte de granulations; en effet, ces dernières, étant immobiles, subissent le sort des poudres inertes injectées dans le péritoine; elles adhèrent aux parois de la cavité (surtout au grand épiploon) d'autant plus vite que les mouvements péristaltiques de l'intestin opèrent un brassage plus complet du liquide péritonéal; ce dernier devient ainsi rapidement clair et privé de particules en suspension.

Si donc, dans le cas qui nous occupe, nous désirons suivre l'évolution ultérieure du processus, il faudra l'étudier non plus dans le liquide cavitaire, mais bien à la surface du péritoine, sur des frottis ou sur des coupes de l'épiploon.

Nous constaterons alors qu'en ce point un bon nombre de microorganismes conservent leur forme vibrionienne, et que la transformation en granulations extracellulaires n'est jamais intégrale; ces vibrions sont d'ailleurs immobiles, comme les granulations. Un fait également intéressant est que, tandis que les phagocytes englobent activement les granulations, ils refusent les vibrions, si bien que 6-7 heures après l'injection, l'englobement des granulations étant achevé à la surface du péritoine, il ne reste plus, à l'intérieur des phagocytes, que des vibrions bien colorables.

Ces vibrions, d'ailleurs, sont englobés à leur tour et enfermés dans des vacuoles intracellulaires: à ce moment, les leucocytes de l'exsudat sont tous d'aspect absolument sain. Vingt-quatre heures après le début de l'expérience, le microscope ne décèle plus de microbes intra ou extra cellulaires; cependant une trace de l'exsu-

dat,ensemencée sur gélose, donne encore à ce moment une culture pure de vibrions; à la surface du péritoine se trouve un épais dépôt de leucocytes et de fibrine; de nombreux mononucléaires à noyau vésiculeux se gorgent en ce moment de polynucléaires. Vers la 30^e heure, l'exsudat est stérile.

La guérison de l'animal est la règle lorsque l'on injecte le sérum précentif en même temps que la dose mortelle de vibrions. L'animal guérit encore lorsque l'injection du sérum a lieu 1-2 heures après celle des vibrions; si l'on dépasse ce temps, il meurt toujours, malgré la transformation complète des vibrions en granulations.

On sait, en effet, combien l'intoxication cholérique présente chez le cobaye une marche rapide : dans le cas dont nous venons de parler, l'intoxication est déjà consommée quand interviennent les facteurs de la défense. Lorsque l'injection de sérum suit de 3 heures celle des vibrions, la transformation en granulations est instantanée et presque complète; si l'on dépasse ce moment; si le sérum, par exemple, n'est injecté que 4-5 heures après les vibrions, on trouve un nombre de plus en plus grand de vibrions qui conservent leur forme. Il est probable qu'à mesure que se prolonge leur séjour dans l'organisme, la virulence des vibrions augmente; par conséquent, leur résistance à la substance bactéricide croît également.

Voici comment se passent les choses lorsque l'injection de sérum a lieu 3 heures après celle des vibrions : immédiatement avant l'injection de sérum, l'exsudat péritonéal contient une quantité colossale de vibrions entiers, très mobiles, bien colorables. La leucocytose est nulle et la phagocytose également. Les quelques leucocytes présents dans le liquide sont d'aspect absolument normal. Cinq minutes après l'injection, l'aspect des leucocytes a changé totalement; leurs bords sont flous, et ils présentent une zone glaireuse des plus nettes, la phagolyse est ici manifeste. Il est rare, à ce moment, de rencontrer encore ça et là un vibron ayant conservé sa forme; presque tous sont transformés en grosses granulations non réfringentes, franchement colorées en violet. Une heure après l'injection de sérum, les leucocytes pénètrent en grand nombre dans l'exsudat et l'englobement commence; au bout de 3 heures, la leucocytose a augmenté; il n'y a plus guère de granulations libres dans l'exsudat. Remarquons en passant que le nombre des leucocytes

immigrés est infiniment moins grand que dans les cas où le sérum est injecté en même temps que les vibrions. A ce moment, il y a un grand nombre de granulations libres, mêlées à des vibrions entiers, à la surface du péritoine. La phagocytose en ce point est des plus énergiques. Quand la mort survient assez rapidement, c'est-à-dire 12-15 heures après l'injection des vibrions, il n'y a plus de granulations libres à la surface du péritoine; on ne trouve plus dans le liquide que quelques rares vibrions; les leucocytes sont pleins à éclater de granulations prenant la couleur avec plus ou moins d'intensité. Si, au contraire, la mort tarde à venir, si l'animal ne succombe que 24 ou 30 heures après l'injection des vibrions, on trouve fréquemment à l'intérieur des leucocytes des vibrions extrêmement courts, virgulaires, la grosse extrémité coiffée souvent d'une granulation de Pfeiffer. Il s'agit là d'une croissance intra-cellulaire des boules de Pfeiffer; il est facile, avec un bon objectif et un fort éclairage, de retrouver tous les stades intermédiaires entre les granulations sphériques et les virgules bien développées.

Un fait qui frappe l'observateur est que ces jeunes vibrions, isolés à l'intérieur des leucocytes polynucléaires, se présentent à l'intérieur des mononucléaires sous forme d'amas: fait d'autant plus curieux que, ainsi qu'il a été nettement établi par Salimbeni, la transformation des vibrions en boules n'a pas lieu dans le protoplasma des mononucléaires. Voici l'explication possible du phénomène: le protoplasma des leucocytes polynucléaires est infiniment plus bactéricide pour les vibrions que celui des mononucléaires; parmi les granulations englobées par les polynucléaires, très peu ont pu résister aux sucs digestifs et regermer: d'où l'isolement et la rareté relative des jeunes vibrions dans ces éléments. Au contraire, les mononucléaires, grands mangeurs de polynucléaires affaiblis, mettent de la sorte en liberté, avant leur destruction complète, de véritables amas de granulations englobées par ces derniers; ces granulations regerment dans le protoplasma des mononucléaires, incapable de produire la transformation en boules, et y forment les petits paquets de virgules qu'on y observe. Toujours au voisinage de ces paquets on trouve des débris de noyaux digérés. Dans les cas où la mort survient tardivement, on trouve constamment à la surface du péritoine, en dehors des cellules, de nombreux vibrions libres,

très courts, vraisemblablement issus de granulations et sortis des leucocytes, constituant ainsi une race plus virulente, mieux adaptée au milieu bactéricide que la race primitive.

Jusqu'ici, l'étude des phénomènes qui accompagnent l'injection du sérum dans le péritoine nous apprend : *a*) que d'une façon constante les phagocytes pénètrent dans l'exsudat peu de temps après l'injection, et englobent les granulations, qui jamais ne se dissolvent librement dans le liquide péritonéal. *Les phagocytes sont les seuls agents de la destruction des granulations* : *b*) que, lorsque les granulations semblent disparaître de l'exsudat en s'y dissolvant, il s'agit en réalité d'un transport de ces éléments inertes à la surface du péritoine : c'est en ce point que s'opère leur destruction en masse ; *c*) que le sérum agit d'une part en attirant les leucocytes dans l'exsudat (la diapédèse commence toujours, en effet, dans l'heure qui suit l'injection), de l'autre en provoquant la phagolyse et, par là, la transformation des vibrions en granules : sous cette dernière forme, peu virulente, les microbes sont très rapidement englobés, ce qui débarrasse en très peu de temps l'organisme de la presque totalité de ses envahisseurs ; *d*) que la précocité de la défense (transformation en granules et phagocytose) est une condition *sine qua non* pour la guérison de l'animal ; les cobayes meurent en effet intoxiqués, lorsque l'injection de sérum retarde de 3 heures seulement sur l'injection de vibrions, et cela malgré la transformation complète des vibrions en granulations.

IV

Comment la marche des phénomènes que nous avons étudiés jusqu'à présent se trouve-t-elle modifiée quand on suspend pour un certain temps l'activité des leucocytes ? C'est ce que nous allons tâcher d'établir dans le chapitre présent.

Pour obtenir ce résultat, nous employons la teinture d'opium en injection sous-cutanée, à la dose de 1 c. c. de teinture française pour 200 grammes d'animal. La narcose qui en résulte dure de 2 à 4 heures. Avant d'étudier l'influence de cette narcose sur la marche de l'infection vibrionienne, déterminons d'abord son action sur les leucocytes eux-mêmes.

Sous la peau de l'oreille de deux cobayes vaccinés contre le

choléra, introduisons une série de tubes capillaires fermés à un bout et contenant une émulsion de vibrions; soumettons l'un des animaux à la narcose par l'opium, et examinons les tubes retirés d'heure en heure: le narcotisé commence à se réveiller au bout de deux heures; à ce moment, aucun leucocyte n'a pénétré dans les tubes; chez le témoin, les tubes contiennent un bouchon leucocytaire de 2 mm. de longueur environ. Deux heures plus tard, les tubes, chez le narcotisé, ne renferment aucun leucocyte; chez le témoin, les bouchons leucocytaires atteignent une longueur de 4 mm. Deux heures après (c'est-à-dire 6 heures après le début de l'expérience) les tubes du narcotisé contiennent un bouchon leucocytaire de 2 millimètres de long; dès cet instant, la pénétration des leucocytes dans les tubes va se faire avec rapidité.

La narcose des leucocytes a donc duré 5 heures environ: la diapédèse de ces éléments a été suspendue dès le début du phénomène, et cela malgré la dilatation vasculaire qui existe chez l'animal durant tout le temps de la narcose. Il y a lieu de se demander si, au cours de cette anesthésie, la motilité, la sensibilité tactile et la sensibilité chimiotactique ont été également atteintes chez les cellules migratrices.

Faisons à un cobaye narcotisé une injection intrapéritonéale d'encre de Chine délayée dans de l'eau physiologique tiède (à 37°5). Si nous retirons une goutte d'exsudat un quart d'heure après l'injection, nous constaterons que le nombre des leucocytes est très faible et ne dépasse pas la proportion normale des leucocytes intrapéritonéaux. Tous contiennent cependant un certain nombre de grains noirs. Cette absence complète de diapédèse dure 2 1/2 à 3 1/2 heures environ, ainsi que le prouve l'examen des exsudats péritonéaux et des coupes de l'épiploon; par conséquent, dès le début de la narcose, il y a chez les leucocytes suppression de la diapédèse, mais persistance de la motilité et de la sensibilité tactile, puisqu'ils sont encore capables d'englober les corps au contact desquels ils arrivent. Nous devons donc considérer la sensibilité chimiotactique comme la première atteinte.

La dilatation vasculaire et l'hyperhémie des vaisseaux sont cause qu'une certaine quantité de sang passe à travers les parois des capillaires dans la cavité péritonéale durant les deux

premières heures de la narcose; c'est ainsi que bon nombre de leucocytes se trouvent entraînés mécaniquement avec les globules rouges, si bien que 3 heures environ après l'injection, *malgré l'absence absolue de diapédèse*, le nombre des globules blancs a augmenté dans l'exsudat (leur proportion, relativement aux hématies, est sensiblement la même qu'à l'intérieur des vaisseaux). Tous ces globules blancs nouvellement arrivés sont vides; aucun ne contient de grains noirs; leur motilité et leur sensibilité tactile sont donc abolies. *C'est donc 3 heures environ après l'injection d'opium que la narcose des leucocytes est la plus profonde*; elle correspond au moment où l'animal donne les premiers signes du réveil. Cette phase de narcose profonde apparaît d'autant plus vite que la dose d'opium injecté est plus forte, ou que l'absorption en est plus rapide. Ainsi, si la dose de 1 c. c. d'opium pour 200 grammes d'animal est directement injectée dans le péritoine, la phagocytose est abolie dès le début.

Des frottis d'épiploon et des coupes du même organe, faits à différents moments de la narcose, nous apprennent que la diapédèse commence à se faire vers la 5^e heure (l'étude des tubes capillaires nous l'avait déjà prouvé). A partir de ce moment, l'englobement des granules d'encre de Chine se fait avec la plus grande rapidité; cet englobement est surtout énergique à la surface de l'épiploon sur laquelle se sont déposés la plupart des granules de l'exsudat. (Sur la localisation de l'encre de Chine injectée dans la cavité péritonéale, voir le mémoire récent de M. Pieralini). Cette dissociation de la sensibilité chimiotactique d'une part, de la sensibilité tactile et de la motilité de l'autre sous l'influence de l'opium, apparaît bien plus nettement encore si l'on a eu soin, 24 heures à l'avance, d'injecter dans le péritoine des cobayes, 5 c. c. d'eau physiologique. Chez les cobayes ainsi préparés, puis soumis à la narcose, 15 minutes après l'injection intrapéritonéale d'encre de Chine, tous les leucocytes de l'exsudat, fort nombreux à ce moment, sont gorgés d'une quantité énorme de grains noirs; les mononucléaires en particulier sont bourrés à éclater. Il n'y a pas là, au point de vue de l'énergie de la phagocytose, de différence entre un cobaye ayant reçu de l'opium et un témoin, également préparé dès la veille, mais non narcotisé. Au contraire, tandis que chez le témoin non narco-

tisé, le nombre des leucocytes de l'exsudat croît rapidement pendant les premières heures qui suivent l'injection de sépia (53,000 à 97,000 par mm. c. d'exsudat), leur nombre chez les narcotisés reste stationnaire durant les 4 heures qui suivent l'injection d'opium. Par conséquent, dans le cas de cobayes préparés, la narcose n'atteint que la sensibilité chimiotactique des globules blancs.

Ainsi donc : la teinture d'opium supprime presque instantanément la diapédèse, en abolissant chez les leucocytes la sensibilité chimiotactique. L'état le plus profond de narcose s'observe 3 heures environ après l'injection d'opium : à ce moment, la motilité et la sensibilité tactiles sont abolies ; les cellules ne phagocytent plus. L'injection préalable d'eau physiologique dans le péritoine est impuissante à empêcher l'anesthésie chimiotactique ; elle conserve au contraire aux leucocytes, malgré la narcose, la motilité et la sensibilité tactile.

V

Chez les cobayes possédant l'immunité naturelle ou acquise, la guérison est fonction de l'activité phagocytaire. — Tout autre est l'issue de la lutte, ainsi que nous l'avons établi dans un travail antérieur, quand on paralyse l'action des leucocytes en narcotisant l'animal. Un cobaye solidement vacciné contre l'infection vibrionienne reçoit sous la peau 1 c. c. de teinture d'opium par 200 grammes, et dans le péritoine une émulsion de vibrions non mortelle pour un témoin non narcotisé. Dans ce cas, l'animal meurt d'intoxication cholérique. Si nous suivons les péripéties de la lutte, voici ce que nous apprend l'étude combinée de l'exsudat péritonéal et des coupes de l'épiploon : malgré la dilatation et l'hyperhémie considérable des vaisseaux, malgré l'hyperleucocytose notable du sang, aucune diapédèse ne se produit pendant les premières heures qui suivent l'injection d'opium, et ce n'est que 5, 6 heures après cette injection que les leucocytes commencent à apparaître dans la cavité péritonéale ; nous sommes de la sorte ramenés au cas d'un cobaye neuf, non immunisé : 6, 8 heures suffisent en effet pour tuer, avec la dose de vibrions employés, un cobaye non vacciné. — Pendant ce temps, les vibrions pullulent et l'intoxication de l'organisme

a lieu, ainsi qu'en témoigne la courbe progressivement descendante de la température; les vibrions conservent entièrement leur mobilité, leur colorabilité, et l'on ne trouve pas de granulations dans l'exsudat. Vers la 5^e heure, la diapédèse commence et devient rapidement très abondante; la cavité péritonéale se remplit de leucocytes polynucléaires qui englobent des quantités énormes de microbes. — L'animal meurt toujours avec 5, 6 heures de retard sur les témoins non vaccinés, et la mort survient de 14-18 heures après l'injection; à ce moment on ne trouve plus de vibrions libres dans l'exsudat : tous sont enfermés à l'intérieur des leucocytes polynucléaires et transformés, pour la plupart, en granulations grosses ou petites : ces dernières prennent souvent l'éosine.

Sur les coupes de l'épiploon, on trouve sous l'endothélium une grande quantité de petits amas vibrioniens donnant l'impression de colonies développées sur place. Un examen attentif permet de constater que ces amas sont contenus à l'intérieur de leucocytes polynucléaires démesurément distendus et à noyau ayant subi la chromatolyse; c'est un phénomène comparable à la pullulation intraleucocytaire des vibrions en goutte suspendue. Or jamais on ne l'observe chez les cobayes non soumis à l'action de l'opium. Dans le cas qui nous occupe, les leucocytes ont retrouvé à un certain moment leur activité phagocytaire; mais bon nombre d'entre eux, encore affaiblis par la narcose, ont succombé à l'action des vibrions englobés et sont devenus autant de centres de multiplication.

L'étude que nous venons de faire est des plus intéressantes en ce qu'elle nous démontre : 1^o que chez les cobayes vaccinés contre le vibrion cholérique les humeurs ne sont pas bactéricides pour ce vibrion, puisque les microorganismes ont pu y vivre et s'y multiplier à l'aise jusqu'à l'arrivée des leucocytes; 2^o que la guérison de l'animal dépend de la précocité de l'intervention leucocytaire; le temps nécessaire à l'intoxication de l'organisme dépassé, l'action des phagocytes ne sert à rien (peut-être à retarder légèrement le moment de la mort) : en effet, l'animal meurt, bien que ne présentant plus de microbes libres dans son péritoine.

Ainsi donc, chez des animaux immunisés activement, la narcose supprime l'immunité en paralysant l'action phagocytaire.

Que se passe-t-il quand on soumet à l'action de l'opium des animaux auxquels, en même temps que des vibrions, on injecte du sérum préventif dans le péritoine? Voici le résultat des expériences extrêmement nombreuses que nous avons faites à ce sujet.

Nous savons que chez un cobaye qui reçoit, en même temps qu'une dose mortelle de vibrions dans le péritoine, une dose suffisante de sérum préventif, la guérison est la règle; elle devient l'exception si, avant d'injecter le mélange, on narcotise l'animal au moyen de la teinture d'opium. Les $\frac{4}{5}$ des animaux environ succombent dans ce cas à l'intoxication au bout d'un temps qui varie de 20 à 70 heures. — Il y a donc, quand l'animal meurt, un retard très considérable sur les témoins qui n'ont pas reçu de sérum. Voici comment les choses se passent :

Dans les cas où la mort survient assez rapidement (au bout de 24 heures, par ex.) la transformation des vibrions en granulations se fait plus lentement que chez les cobayes qui n'ont pas reçu d'opium; chez ces derniers, la transformation est presque complète au bout de 10 à 15 minutes; il faut $\frac{1}{2}$ h. ou $\frac{3}{4}$ h. chez les narcotisés pour arriver au même point. — De plus, les granulations disparaissent ici de l'exsudat bien moins vite que chez les témoins, ce qui doit être attribué au fait que l'opium arrête le péristaltisme intestinal. — Dans l'exsudat examiné $\frac{1}{4}$ h. après l'injection, les leucocytes montrent les signes de phagolyse et n'englobent pas les microbes; la diapédèse commence à se faire 2 heures environ après le début de la narcose; à partir de ce moment, les leucocytes immigrés englobent activement les granulations, mais refusent d'une façon absolue les vibrions entiers, toujours assez nombreux dans l'exsudat. A partir de la 5^e heure, granulations et vibrions disparaissent de l'exsudat; c'est à la surface du péritoine qu'il faut les chercher; on les y trouve en quantité. — Vers la 20^e heure, la surface du mésentère et de l'épiploon est recouverte d'un nombre très grand de leucocytes bourrés de granulations; il n'y a plus de granulations libres. — Par contre, on trouve en dehors des cellules un nombre considérable de petits vibrions courts qui dès lors se multiplient jusqu'à la mort de l'animal. A ce moment l'exsudat contient une foule de vibrions bien mobiles.

Il est bien certain que dans ce cas les vibrions restés en

dehors des phagocytes représentent des individus particulièrement virulents, que les leucocytes, déprimés par l'opium, évitent de saisir. Cette abstention des globules blancs a pour conséquence la mort de l'animal.

Quand la mort ne survient que 60 ou 70 heures après l'injection, voici les faits très intéressants que l'on peut observer : il y a dès le début une transformation des vibrions en granules beaucoup plus complète et plus rapide que dans le cas précédent (quelques vibrions gardent cependant leur forme). Au bout de 8 heures, les granulations sont toutes englobées par les phagocytes. Au bout de 24 heures, il n'y a plus de granulations dans l'exsudat, mais celui-ci renferme un nombre considérable de vibrions courts et très mobiles ; le nombre de leucocytes présents est faible et la phagocytose nulle. Vers la 30^e heure, les vibrions sont très nombreux ; beaucoup de leucocytes ont également pénétré dans l'exsudat, mais ils n'englobent que très peu de microbes. Vers la 40^e heure, on constate une phagocytose énergique ; les vibrions englobés se transforment en granulations à l'intérieur des phagocytes. A la mort de l'animal, vers la 70^e heure, les vibrions ont disparu de l'exsudat ; sur toute la surface du péritoine, il y a un nombre colossal de leucocytes en général vides ; le nombre des vibrions libres est minime.

Voici comment on doit interpréter les faits dans cette lutte prolongée : les leucocytes, sortis de leur narcose, ont englobé les granulations, peu virulentes et trop peu toxiques pour avoir pu déjà intoxiquer l'organisme ; parmi les vibrions injectés, les individus plus virulents, moins sensibles à la substance bactéricide, ont gardé leur forme vibrionienne et n'ont pas été englobés. Vers le moment où les leucocytes ayant reconquis toute leur activité eussent dû les saisir, ils se sont trouvés en présence de vibrions bien adaptés maintenant au milieu péritonéal et d'une virulence exaltée ; d'où éloignement des leucocytes, absence de phagocytose, pullulation des vibrions et intoxication de l'organisme. Durant cette deuxième phase de la lutte, les leucocytes à leur tour se sont accoutumés au milieu nouveau, ont fini par revenir et par englober énergiquement les microorganismes. Malgré la destruction presque complète de ces derniers, l'animal a succombé à l'intoxication.

Ainsi donc : si chez un animal qui a reçu dans le péritoine un

mélange de vibrions et de sérum préventif, on retarde l'intervention des phagocytes et si on affaiblit leur activité au moyen de la narcose, l'animal mourra intoxiqué malgré la transformation des vibrions en granulations. En effet, les phagocytes auront été incapables d'arrêter la pullulation de ceux des vibrions, particulièrement virulents, qui n'ont pas subi la transformation de Pfeiffer. Le phénomène de Pfeiffer est donc incapable à lui seul de protéger l'organisme : dans ce cas, comme dans celui de l'immunité active, la phagocytose est la condition indispensable pour débarrasser l'organisme de ses parasites.

Si, maintenant, nous faisons varier les conditions de l'expérience, et si, au lieu d'injecter le sérum préventif à l'animal narcotisé en même temps que les vibrions, nous l'injectons plus tard, voici ce que nous constaterons : tant que l'injection du sérum a lieu dans les 2 heures qui suivent celle des vibrions, ceux-ci se transforment en granulations ; si le sérum est injecté entre 2 heures $1/2$ et 3 heures et $1/2$, la transformation ne se fait plus : les vibrions restent entiers et bien mobiles ; si l'on dépasse ce temps, la tendance à la transformation se manifeste de nouveau ; la transformation est complète si l'injection de sérum a lieu 5 ou 6 heures après celle des vibrions.

Analysons de plus près ce phénomène, et voyons ce qui se passe dans le cas suivant : un cobaye narcotisé reçoit dans le péritoine une dose mortelle de vibrions cholériques. Trois heures plus tard on lui injecte dans le péritoine 1 goutte de sérum préventif. L'exsudat examiné *immédiatement avant* l'injection du sérum fourmille de vibrions bien mobiles ; les rares leucocytes que l'on y trouve ne contiennent pas de vibrions. Leur aspect est normal.

L'exsudat, examiné $1/2$ d'heure après l'injection de sérum, présente des caractères identiques : les vibrions sont entiers, mobiles. Dans la plupart des cas on ne trouve aucune granulation de Pfeiffer ; dans quelques cas, exceptionnels, de rares vibrions ($1/100$ environ) sont transformés. *Quant aux leucocytes de l'exsudat, ils ont conservé la netteté de leurs contours ; ils ne présentent aucun signe de phagolyse.*

Deux heures environ après l'injection de sérum, les leucocytes commencent à pénétrer en foule dans l'exsudat et l'englobement des vibrions commence ; ceux-ci se transforment à l'intérieur des cellules en granulations arrondies. L'animal meurt

12 ou 15 heures après l'injection des vibrions : à ce moment la phagocytose, bien qu'énergique, est incomplète. A aucun moment il n'y a eu transformation extracellulaire des vibrions.

Très manifestement, dans ce cas, la non-transformation des vibrions en granulations est liée à l'absence de phagolyse. Pourquoi cette phagolyse n'a-t-elle pas lieu chez les cobayes qui reçoivent le sérum vers la 3^e heure de la narcose? L'interprétation en est difficile à donner dans l'état actuel de nos connaissances; rappelons-nous seulement que c'est le moment où la narcose des éléments migrants est la plus profonde, celui où tous les ordres de sensibilité sont le plus déprimés en eux.

Nous recommandons, pour l'étude de ce phénomène, des cobayes pas trop âgés, bien sensibles par conséquent à l'action de l'opium. Ceux de 300 grammes sont les plus convenables à cet effet.

De cette série d'expériences ressort l'étroite connexion qui existe entre la transformation des vibrions en granulations et la phagolyse leucocytaire; c'est ainsi que, au cours de la narcose, le seul moment où cette transformation n'a pas lieu est précisément celui où l'on n'observe aucune phagolyse. — Cette phagolyse doit être considérée comme une forme particulière et anormale de la fonction phagocytaire : elle paralyse l'activité d'un grand nombre de vibrions et rend leur englobement plus facile. Mais elle est loin d'être suffisante pour la protection de l'organisme; la guérison ne survient en effet que si les phagocytes détruisent les microorganismes de l'exsudat (granulations et vibrions); supprimons en effet leur intervention ou retardons-la, et l'animal mourra.

Voilà pourquoi, chez les animaux auxquels le sérum est injecté quand l'intoxication a déjà eu lieu (3 heures, par exemple, après les vibrions), la mort survient malgré la transformation intégrale en granulations. — Voilà pourquoi la narcose par l'opium, qui fait arriver les phagocytes en retard et affaiblis sur le champ de lutte, détermine le plus souvent la mort de l'animal : dans ce cas, en effet, d'une part, les phagocytes ne retrouvent pas la force nécessaire pour détruire à temps les vibrions particulièrement virulents qui n'ont pas subi la transformation; de l'autre, il arrive fréquemment que les granulations englobées repullulent dans le protoplasma des leucocytes tués, contribuant ainsi à la réinfection du péritoine. Ce dernier

fait est également intéressant en ce qu'il nous prouve la nature vivante des granulations de Pfeiffer.

VI

Si, dans les cas de narcose, la mort d'un animal est réellement due à l'affaiblissement de ses phagocytes, il est naturel de supposer que le résultat sera tout autre si l'on prend soin de surexciter préalablement leur activité de façon à atténuer les effets de la narcose. — Nous avons dit, en effet, que chez des animaux préparés au moyen d'une injection péritonéale d'eau physiologique, la narcose suspend la diapédèse (par suite de l'anesthésie chimiotactique), mais laisse subsister la sensibilité tactile et la motilité.

Et, en effet, chez des cobayes auxquels on a injecté, la veille, dans le péritoine, 5 c. c. d'eau physiologique, on a beau faire varier les conditions de l'expérience, injecter le sérum longtemps après les vibrions, narcotiser l'animal, *la guérison survient toujours*. Voici un rapide exposé des phénomènes que l'on observe dans ces différents cas.

Nous savons qu'un cobaye ainsi préparé se trouve immunisé au bout de 24 heures contre une dose de vibrions mortelle pour un témoin. Le fait a été démontré par Issaëff en 1893. Au moment de l'injection vibrionienne, il y a dans l'exsudat péritonéal de 50,000 à 70,000 leucocytes polynucléaires par millimètre cube. — Dix minutes après l'injection des vibrions, les leucocytes ont déjà englobé de nombreux microbes; un très grand nombre de microbes englobés sont tués immédiatement sans prendre la forme de gros granules; ils perdent rapidement leurs affinités colorantes et se transforment en granulations fines. Il n'y a aucune transformation extracellulaire de microorganismes. — Le nombre des leucocytes augmente rapidement dans l'exsudat. Au bout de 7-8 heures, l'englobement est terminé; il n'y a plus de vibrions libres.

Si, *en même temps* que les vibrions, nous injectons une goutte de sérum immunisant, il n'y a pas, ainsi que l'a établi M. Metchnikoff, de transformation extracellulaire des vibrions en granules. L'englobement des microbes est ici, pour ainsi dire, instantané; instantanée également leur transformation intracellu-

laire en granulations. Nous avons pu constater nous-même que les rares microbes non englobés conservent la forme vibriennienne. — Dans l'exsudat, *tous* les leucocytes sont bondés de granulations; aucun ne présente le phénomène de la phagolyse.

Si, au contraire, nous injectons le sérum 3 heures après les *vibrions*, la transformation intégrale des vibrions non englobés a lieu dans l'exsudat; un quart d'heure après l'injection du sérum, tous les vibrions intra ou extracellulaires sont transformés en granules. Très rapidement, d'ailleurs, les granulations extraleucocytaires sont englobées et l'animal guérit. Il semble donc que, par suite de la lutte menée depuis trois heures contre les vibrions, les phagocytes aient perdu de la suractivité qui leur permettait d'échapper à la phagolyse.

Quelles sont les péripéties de la lutte chez les cobayes narcotisés? (Nous avons dit que, même dans ce cas, la guérison est la règle.)

Un premier fait, très intéressant, c'est que, lorsque après avoir narcotisé un cobaye préparé par l'eau physiologique, on lui injecte dans le péritoine des vibrions *sans sérum*, une grande partie des vibrions ($1/4$ ou $1/2$) est, malgré cela, transformée en dehors des cellules en granulations de Pfeiffer. — On trouve dans l'exsudat, un quart d'heure après l'injection des microbes, un certain nombre de leucocytes phagolysés, entourés d'une zone albumineuse bien nette, et n'englobant aucun microbe. — A part ces quelques éléments souffrants, tous les leucocytes présents englobent avec rapidité granules et vibrions. — Pendant les 4 heures qui suivent, le nombre des leucocytes de l'exsudat n'augmente pas, ce qui n'empêche que l'immense majorité des microorganismes sont déjà phagocytés quand commence la diapédèse : la narcose, en empêchant cette dernière de se produire, n'a cependant pas supprimé la sensibilité tactile ni la motilité des cellules. La presque totalité des vibrions se trouvant de la sorte détruits dès le début du processus, l'animal guérit.

Il y a lieu de se demander comment on pourrait expliquer ici la transformation d'une partie des vibrions en granulations extracellulaires? Tous les leucocytes contiennent à l'état normal une certaine quantité de substance bactéricide capable de trans-

former en granulations les vibrions englobés; ici, les leucocytes, étant en état de suractivité fonctionnelle, ont élaboré à leur intérieur une quantité de substance bactéricide supérieure à la normale (comme en témoigne la rapidité avec laquelle sont détruits les vibrions englobés); il suffit donc qu'un petit nombre d'entre eux éclatent dans l'exsudat pour lui communiquer des propriétés bactéricides.

Or, dans un exsudat aussi riche en cellules que celui qui nous occupe, on conçoit qu'il y ait toujours quelques éléments, plus particulièrement atteints par la narcose, qui se laissent surprendre par le brusque contact de l'émulsion vibrionienne et subissent ainsi la phagolyse; d'où production partielle du phénomène de Pfeiffer.

Nous voyons donc que l'opium atténue jusqu'à un certain point l'excitabilité des leucocytes surexcités par l'injection d'eau physiologique. Aussi n'est-il pas étonnant que lorsque l'on injecte, dans ce cas, aux cobayes narcotisés, une goutte de sérum préventif en même temps que les vibrions dans le péritoine, il y ait transformation intégrale, en dehors des leucocytes, des vibrions en granulations de Pfeiffer; c'est ce qui a lieu en effet. Le nombre des vibrions qui gardent leur forme est minime. — Malgré l'absence de diapédèse, l'englobement des microorganismes se fait rapidement, et, 5 heures après l'injection, il n'y a plus en dehors des cellules ni granulations ni vibrions. L'animal guérit. Cette dernière série d'expériences ne fait que confirmer la relation qui existe entre la phagolyse et la transformation extracellulaire des vibrions; toute cause qui suspend la première supprime la seconde. Nous n'insisterons pas davantage sur un fait surabondamment démontré.

VII

Il résulte de ce qui a été dit jusqu'ici que, même dans le cas où la transformation extracellulaire des vibrions a lieu, l'organisme ne résiste que grâce à l'intervention de ses phagocytes; les granulations de Pfeiffer, en effet, ne représentent nullement des microbes morts; elles sont bien vivantes et capables de germination.

Quant aux vibrions tués, ils ne prennent *jamais* la forme de

granulations. Nous avons déjà signalé au cours de notre travail que les vibrions tués par les phagocytes, aussitôt après leur englobement (ce que l'on reconnaît au fait qu'ils ne se colorent plus que très mal), ne se transforment jamais en granulations de Pfeiffer.

Si l'on stérilise une émulsion de vibrions dans l'eau physiologique, soit par la chaleur à 90° pendant 10 minutes, soit par le chloroforme, et que l'on injecte cette émulsion, additionnée de dix gouttes de sérum préventif, dans le péritoine d'un cobaye neuf, *jamais* les vibrions injectés ne subissent la transformation en granules; ils gardent leur forme et prennent mal la couleur. — On les retrouve ainsi pendant 3-4 heures à la surface de l'épiploon; il ne sont en effet englobés que très tardivement par les phagocytes. Ces mêmes vibrions donnent au contraire nettement le phénomène de l'agglutination; ils se présentent en grumeaux dans l'exsudat retiré 5 minutes après l'injection.

Nous avons d'ailleurs constaté à plusieurs reprises, dans les chapitres précédents, que les granulations reprennent fréquemment la forme vibrionienne, soit à l'intérieur des leucocytes, soit dans le liquide de l'exsudat. Il est aisé d'observer directement ce phénomène de regermination. Émulsionnons, en effet, une culture de vibrions dans 2 c. c. de liquide composé en parties égales d'eau physiologique et de sérum préventif. Introduisons le tout dans un sac de collodion, hermétiquement clos, que nous plaçons dans la cavité péritonéale d'un cobaye. Quatre jours après retirons le sac. Nous trouverons que *tous* les vibrions contenus à son intérieur ont la forme de grosses granulations, rondes, prenant bien la couleur; aucun ne possède la forme vibrionienne. Ensemençons avec le contenu du sac une série de gouttes suspendues, composées d'eau peptonisée et portées à l'étuve à 37°. Il est dès lors facile d'examiner une goutte d'heure en heure sous le microscope; on voit au bout de 5-6 heures un grand nombre de granulations pousser une petite pointe effilée qui leur donne bientôt l'aspect d'un bouchon de carafe court et à très grosse tête; le petit appendice s'allonge en s'incurvant, et bientôt on se trouve en présence d'une virgule peu allongée et à grosse extrémité très renflée.

Les granulations de Pfeiffer représentent donc des microorganismes vivants, immobiles et à virulence atténuée (ils

sont, en effet, saisis par les phagocytes avant les formes vibrionniennes), mais aptes à repulluler s'ils ne sont englobés à temps. La transformation des vibrions en granules constitue un phénomène actif de la part de ces vibrions, qui revêtent ainsi la forme sous laquelle leur surface de contact avec un milieu défavorable est minima; les granulations extracellulaires de Pfeiffer sont identiques aux grosses granulations intracellulaires que l'on observe à l'intérieur des leucocytes qui ont englobé des vibrions. Tout comme les formes vibrionniennes allongées, elles se fragmentent, après l'action des sucs digestifs, en fines granulations qui prennent mal les couleurs basiques et deviennent rapidement éosinophiles. Cette dernière transformation n'a jamais lieu à l'extérieur des leucocytes.

Il est à peine besoin d'indiquer ici que ces granules de Pfeiffer n'ont rien à faire avec des spores; ils ne résistent, en effet, ni à la dessiccation ni à une chaleur supérieure à 80°.

Il arrive parfois qu'après la transformation extracellulaire des vibrions, un certain nombre de granulations périssent directement dans le liquide (le même fait se produit pour des vibrions transportés brusquement dans un milieu nouveau). Ces granulations mortes sont facilement reconnaissables: elles sont comme gonflées, réfringentes, prennent très mal la couleur, et présentent cette coloration gelée de groseille claire que nous avons signalée plus haut. Si l'on produit *in vitro* le phénomène de Pfeiffer, il se trouve toujours parmi les granulations formées quelques grains réfringents; il est aisé de se rendre compte que jamais ces dernières formes ne regerment. Elles sont d'ailleurs relativement rares. Les granulations de Pfeiffer sont constituées par la masse entière du protoplasma vibrionien qui s'est rétracté à l'une des extrémités de la membrane d'enveloppe. Si, en effet, on examine à un très fort grossissement et avec un éclairage puissant les premières phases du phénomène, *in vitro*, on trouve appendues aux granulations des gaines incolores, de même réfringence à peu près que l'eau, qui reproduisent exactement la forme du vibrion, bien que légèrement plus gonflées. Ces gaines vibrionniennes ne tardent pas à se détacher et à devenir bientôt invisibles dans le liquide ambiant.

VIII

Si nous essayons de résumer en quelques mots les résultats de nos recherches, nous dirons que les phagocytes sont les seuls agents destructeurs des vibrions dans les tissus, et que leur intervention est la condition *sine qua non* de guérison pour l'animal : cela est également vrai pour les cas d'immunité active (naturelle ou acquise) et pour les cas d'immunité passive, où la destruction des vibrions est précédée de leur transformation extracellulaire en granulations de Pfeiffer. Dans l'immunité active, en effet, il y a parallélisme constant entre la guérison de l'animal et l'énergie de la phagocytose. La mort survient toutes les fois que l'on suspend, au début du processus, l'activité phagocytaire. On augmente au contraire considérablement la résistance de l'animal en surexcitant l'activité de ses phagocytes. Les cas de mort chez les animaux vaccinés et soumis à la narcose prouvent que les humeurs de ces derniers ne sont point bactéricides.

Dans les cas d'immunité passive où l'injection du sérum préventif détermine la transformation extracellulaire des vibrions, les phagocytes représentent également les véritables agents de la guérison ; l'animal meurt le plus souvent lorsqu'on empêche, par la narcose, les leucocytes d'englober les granulations de l'exsudat : en effet, ces dernières représentent des microorganismes vivants, capables de repulluler. Jamais, d'ailleurs, la transformation en granules n'est complète ; on trouve toujours, à la surface du péritoine, bon nombre de vibrions non transformés qui deviennent le point de départ d'une réinfection s'ils ne sont englobés à temps par les globules blancs. Il suffit, d'autre part, d'atténuer les effets de la narcose en surexcitant par avance l'activité leucocytaire, pour voir l'animal guérir d'une façon constante.

Enfin, la transformation extracellulaire des vibrions, si exceptionnelle qu'elle soit dans la nature, représente elle-même une extension de la fonction phagocytaire, et pour ainsi dire une action enzymotique substituée à l'action intracellulaire ; elle est, en effet, intimement liée à la phagolyse et ne se produit plus quand, dans certaines conditions spéciales de narcotisation, on

empêche la phagolyse de se faire. Remarquons d'ailleurs que cette transformation extracellulaire des vibrions n'est jamais une destruction extracellulaire, et que le sort final de la lutte dépend, même ici, des phagocytes. La preuve que les leucocytes sont bien le siège de la substance bactéricide qui transforme les vibrions en granules est fournie par le fait que le phénomène de Pfeiffer n'est possible à réaliser sous la peau que si l'on amène des leucocytes au contact du sérum préventif (par exemple en ajoutant du pus au mélange injecté).

BIBLIOGRAPHIE

J. BORDET. Les Leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1893. IX, 462.)

J. CANTACUZÈNE. Recherches sur le mode de destruction du vibron cholérique dans l'organisme. — Paris, 1894.

ISSAEFF. Untersuchungen über die Künstliche Immunität gegen Cholera. — (*Zeitsch. f. Hyg.*, 1894. XVI, 287.)

EL. METCHNIKOFF. Études sur l'immunité : sur la destruction extracellulaire des bactéries dans l'organisme. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1893. IX, 369.)

PFEIFFER. Weitere Untersuchungen über das Wesen d. Choleraimmunität, und über specifische bactericide Processe. (*Zeitsch. f. Hyg.*, 1894. XVIII, 1.)

G. PIERALLINI. Sur la Phagolyse dans la cavité péritonéale. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1897. XI, 308.)

SALIMBENI. La Destruction des microbes dans le tissu sous-cutané des animaux hypervaccinés. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1898. XII, p. 192.)

LES VACCINATIONS ANTIRABIKES A L'INSTITUT PASTEUR

EN 1897

PAR M. LE D^r H. POTTEVIN

I

Pendant l'année 1897, 4,521 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 8 sont mortes de la rage. On trouvera leurs « observations » résumées à la fin de ce travail.

Si nous retranchons, des 8 cas de mort que nous venons de signaler, deux cas, ceux de Heniquet et de Morin, dans lesquels la mort est survenue avant que les vaccinations aient pu produire leur effet, les résultats des vaccinations pendant l'année 1897 sont :

Personnes traitées.....	4519
Morts.....	6
Mortalité 0/0.....	0,39

Dans le tableau ci-dessous, ces chiffres sont rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

Années.	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité 0/0
1886	2,671	25	0,94
1887	1,770	14	0,79
1888	1,622	9	0,55
1889	1,830	7	0,38
1890	1,540	5	0,32
1891	1,559	4	0,25
1892	1,790	4	0,22
1893	1,648	6	0,36
1894	1,387	7	0,50
1895	1,520	5	0,33
1896	1,308	4	0,30
1897	4,521	6	0,39

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la rage chez des animaux inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-dessous la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1897. La première colonne de chaque catégorie donne le nombre des mordus; la seconde le nombre des morts; la troisième la mortalité pour cent.

	Morsures à la tête.			Morsures aux mains.			Morsures aux membres.			Totaux.		
Tableau A	45	0	0	81	0	0	46	1	2,1	142	1	0,7
Tableau B	106	0	0	539	4	0,74	273	1	0,4	918	5	0,63
Tableau C	30	0	0	244	0	0	187	0	0	461	0	0
	181	0	0	864	4	0,46	506	2	0,4	1321	6	0,39

Les tableaux suivants, qui contiennent les résultats acquis depuis l'origine des vaccinations, montrent que la gravité des morsures varie avec leur siège, et que la mortalité est toujours inférieure à 1 0/0 pour les personnes mordues par des chiens sûrement enragés.

	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité.
Morsures à la tête . . .	1,759	21	1,1
Morsures aux mains ..	11,118	53	0,47
Morsures aux membres	7,289	22	0,30
	<u>20,166</u>	<u>96</u>	<u>0,46</u>

	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité.
Tableau A	2,872	20	0,69
Tableau B	12,547	61	0,48
Tableau C	4,747	15	0,31
	<u>20,166</u>	<u>96</u>	<u>0,46</u>

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1521 personnes traitées à l'Institut Pasteur en 1897 se répartissent de la façon suivante :

Allemagne	8	États-Unis	4
Angleterre	83	Grèce	1
Belgique	14	Indes Anglaises	33
Égypte	2	Suisse	33

Soit 175 étrangers et 1346 Français.

Le tableau suivant donne la répartition, par départements, des 1346 Français.

Ain.....	10	Gard.....	2	Oise.....	13
Aisne.....	3	Garonne (Haute-)...	41	Orne.....	3
Allier.....	1	Gers.....	18	Pas-de-Calais.....	2
Alpes (Basses-)....	0	Gironde.....	61	Puy-de-Dôme.....	6
Alpes (Hautes-)....	0	Hérault.....	10	Pyrénées (Basses-) .	32
Alpes-Maritimes ...	0	Ille-et-Vilaine.....	13	Pyrénées (Hautes-)..	21
Ardèche.....	2	Indre-et-Loire.....	3	Pyrénées-Orientales	3
Ardennes.....	2	Indre.....	1	Rhône.....	139
Ariège.....	1	Isère.....	24	Rhin (Haut-).....	1
Aube.....	0	Jura.....	3	Saône (Haute-).....	0
Aude.....	19	Landes.....	15	Saône-et-Loire.....	4
Aveyron.....	35	Loir-et-Cher.....	1	Sarthe.....	1
Bouches-du-Rhône .	0	Loire.....	44	Savoie.....	12
Calvados.....	12	Loire (Haute-) . . .	17	Savoie (Haute-).....	14
Cantal.....	13	Loire-Inférieure....	12	Seine.....	349
Charente.....	18	Loiret.....	5	Seine-et-Marne.....	0
Charente-Inférieure	17	Lot.....	31	Seine-Inférieure . . .	25
Cher.....	2	Lot-et-Garonne . . .	26	Seine-et-Oise.....	32
Corrèze.....	14	Lozère.....	5	Sèvres (Deux-).....	8
Corse.....	1	Maine-et-Loire.....	2	Somme.....	7
Côte-d'Or.....	0	Manche.....	9	Tarn.....	15
Côtes-du-Nord.....	17	Marne.....	0	Tarn-et-Garonne... .	35
Creuse.....	1	Marne (Haute-) . . .	2	Var.....	0
Dordogne.....	30	Mayenne.....	2	Vaucluse.....	0
Doubs.....	5	Meurthe-et-Moselle .	1	Vendée.....	11
Drôme.....	1	Meuse.....	1	Vienne.....	9
Eure.....	12	Morbihan.....	9	Vienne (Haute-)....	2
Eure-et-Loir.....	4	Nièvre.....	1	Vosges.....	0
Finistère.....	14	Nord.....	5	Yonne.....	5

OBSERVATIONS

Bourg Camille, 26 ans. — Mordu le 11 avril, traité à l'Institut Pasteur, du 13 au 30 avril. Mort de la rage à l'hôpital Lariboisière, le 26 mai. Les morsures, au nombre de six, pénétrantes, étaient situées sur l'éminence

thénar de la main gauche. Le chien mordeur examiné par M. Grenot, vétérinaire à Paris, avait été reconnu enragé à l'autopsie. — Une autre personne mordue et traitée en même temps que Bourg est actuellement en bonne santé.

FIQUET Louis, 23 ans. — Mordu le 22 avril, traité à l'Institut Pasteur du 23 avril au 10 mai. Mort de la rage à l'hôpital Necker, le 4 juin. Les morsures, au nombre de cinq, dont deux profondes, étaient situées sur la périphérie du pouce droit; elles avaient été cautérisées au bout de cinq heures par un agent chimique indéterminé. — Le chien mordeur, examiné par M. Caussé, vétérinaire à Boulogne-sur-Seine, avait été reconnu enragé à l'autopsie. — Une autre personne mordue en même temps que Fiquet est actuellement en bonne santé.

BEAUFORT Annette, 19 ans. — Avait été léchée le 15 avril sur les mains qui portaient des écorchures à vif par un chien qui, abattu le lendemain, fut déclaré enragé, à l'autopsie, par M. Lachmann, vétérinaire, à Saint-Étienne. — Traitée à l'Institut Pasteur du 20 avril au 7 mai. — Morte de la rage le 14 octobre. — Deux autres personnes mordues par le même chien et traitées à l'Institut Pasteur sont actuellement en bonne santé.

HENIQUET Julien, 53 ans. — Mordu le 11 mai par un chien que M. Jenvresse, vétérinaire à Beaumont-sur-Oise, a déclaré enragé après autopsie. — Une première morsure avait déchiré la lèvre inférieure, les deux bords de la plaie avaient dû être réunis par trois points de suture : trois autres blessures siégeaient à la racine du nez. — Les plaies n'avaient pas été cautérisées. — Traité à l'Institut Pasteur du 18 mai au 5 juin. — Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 4 juin, avant la fin du traitement; la mort est survenue le 7 juin. — La rage ayant éclaté au cours des inoculations, il convient de retrancher Heniquet du nombre des personnes mortes de la rage après traitement.

SEGOND Germain, 7 ans. — Mordu le 23 mai à l'avant-bras droit : la morsure pénétrante avait été faite sur le membre nu; elle avait été cautérisée au fer rouge au bout d'une heure. Traité du 26 mai au 9 juin. Mort de la rage le 22 juillet. Le bulbe du chien mordeur avait été remis à l'Institut Pasteur; un cobaye inoculé dans l'œil le 26 mai a été pris de rage le 10 septembre.

RICHARD Suzanne, 8 ans. — Mordue le 12 juin à la jambe gauche par un chien reconnu enragé après autopsie de M. Touret, vétérinaire à Sannois. — La morsure pénétrante s'étendait sur une longueur de 3 centimètres (les lèvres avaient dû être réunies par des points de suture); elle avait été faite au travers d'une chaussette de coton et cautérisée au bout d'une demi-heure avec un agent chimique indéterminé. — Traitée du 13 juin au 30 juin, morte de la rage le 2 août. (Renseignement de M. le docteur Marguy, à Sannois).

VANDALE Joseph, 33 ans. — Mordu le 8 août à la main gauche. — Les morsures, au nombre de six, pénétrantes, siégeaient sur la face dorsale; elles n'avaient pas été cautérisées. Le chien mordeur avait été déclaré enragé par M. Verraert, vétérinaire à Ostende. — Traité à l'Institut Pasteur, du 11 août au 28 août, mort de la rage le 27 septembre.

MORIN Paul, 38 ans. — Mordu le 24 août à la joue gauche; la morsure unique, qui s'étendait sur une longueur de 2 centimètres, n'avait subi aucune cautérisation. Le chien mordeur, conduit à l'École d'Alfort, le 25 août, fut reconnu enragé. — Traité à l'Institut Pasteur du 26 août au 15 septembre. Mort de la rage quelques jours après la fin du traitement (trois semaines après la morsure, dit la note qui nous a été remise). — Le délai qui s'est écoulé entre la fin du traitement et le début des accidents rabiques étant inférieur à 14 jours, Morin ne doit pas être compté au nombre des personnes ayant subi les inoculations dans les conditions où elles sont efficaces.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.